

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



Alkaloidy *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae): izolace, strukturní identifikace, biologická aktivita.

Alkaloids of *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae): isolation, structure identification, biological activity.

Doktorská disertační práce

Mgr. Eliška Kohelová

Školitelka: prof. Ing. Lucie Cahlíková, PhD.

Studijní obor: Farmakognosie a nutraceutika

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením své školitelky. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při vypracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Hradec Králové, červenec 2021

Mgr. Eliška Kohelová

PODĚKOVÁNÍ

Tato disertační práce vznikla za podpory Specifického vědeckého výzkumu Univerzity Karlovy, Farmaceutické Fakulty v Hradci Králové (SVV 260 548), projektu GA UK 178518, projektu OPVVV: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_017/0002682 a celofakultního výzkumného programu PROGRES, který je na Univerzitě Karlově řešen v rámci Programů rozvoje výzkumných oblastí.

Ráda bych zde poděkovala své školitelce prof. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za vedení v průběhu doktorského studia a PharmDr. Jakubu Chlebkovi, Ph.D. za cenné rady, pomoc a inspiraci při řešení experimentální části práce. Velké poděkování patří i Mgr. Jaroslavu Jenčovi, PhD., který mě uvedl do LC/MS problematiky. Za odbornou pomoc a rady do života bych tímto ráda poděkovala prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. Ráda bych vyjádřila své díky celé katedře farmaceutické botaniky za příjemné pracovní prostředí a přátelský kolektiv.

Za spolupráci při měření biologických aktivit a fyzikálně-chemických vlastností alkaloidů bych chtěla zvlášť poděkovat doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Ph.D. a PharmDr. Janě Maříkové, PhD. za měření a interpretaci NMR spekter alkaloidů, prof. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za změření HRMS spekter nově izolovaných látek, doc. PharmDr. Danielu Junovi, Ph.D. a Mgr. Martině Hrabínové, Ph.D. za stanovení inhibiční POP aktivity, PharmDr. Daniele Hulcové, Ph.D. za změření inhibiční aktivity vůči cholinesterázám, RNDr. Radimu Havelkovi Ph.D. a Mgr. Darje Koutové za měření cytotoxické aktivity.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	7
1 ÚVOD	9
2 CÍL PRÁCE	11
3 TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1 Rostliny čeledi Amaryllidaceae	12
3.1.1 Taxonomické řazení a klasifikace ¹¹	12
3.1.2 Charakteristika amarylkovitých alkaloidů a jejich biosyntéza	13
3.1.3 Strukturní typy amarylkovitých alkaloidů	15
3.1.3.1 Základní strukturní typy Amaryllidaceae alkaloidů	15
3.2 Botanická charakteristika rodu <i>Zephyranthes</i>	29
3.2.1 Přehled fytochemicky studovaných druhů rodu <i>Zephyranthes</i>	32
3.2.1.1 <i>Zephyranthes candida</i> (Lindl.) Herb.	32
3.2.1.2 <i>Zephyranthes carinata</i> Herb.	32
3.2.1.3 <i>Zephyranthes citrina</i> Baker	33
3.2.1.4 <i>Zephyranthes concolor</i> (Lindl.) Benth. & Hook.f.	33
3.2.1.5 <i>Zephyranthes minuta</i> (Kunth) D.Dietr.	34
3.2.1.6 <i>Zephyranthes rosea</i> Lindl.	34
3.2.2 Fytochemicky studované druhy dříve řazené do rodu <i>Zephyranthes</i>	34
3.2.2.1 <i>Habranthus robustus</i> Herb. ex Sweet, dříve <i>Z. robusta</i> (Herb. Ex Sweet). ...	35
3.2.2.2 <i>Habranthus tubispathus</i> (L'Hér.) Traub, dříve <i>Zephyranthes tubispatha</i>	35
3.2.2.3 <i>Pyrolirion flavum</i> Herb., dříve <i>Zephyranthes flava</i> (Herb.)	35
3.3 Biologická aktivita Amaryllidaceae alkaloidů	47
3.3.1 Amaryllidaceae alkaloidy v terapii Alzheimerovy choroby	47
3.3.2 Amaryllidaceae alkaloidy a nádorová onemocnění	52
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	58
4.1 Chemikálie, materiál a instrumentální vybavení pro izolaci alkaloidů	58
4.1.1 Chemikálie a rozpouštědla	58
4.1.2 Vytvájecí soustavy použité při tenkovrstvé chromatografii	59
4.1.3 Adsorbenty pro chromatografii	60
4.1.4 Detekční činidla	61
4.1.5 Pomocný materiál	61
4.1.6 Přístroje	61
4.1.7 Databáze použité pro vyhodnocování výsledků	62

4.2	Chemikálie, materiál a instrumentální vybavení pro stanovení biologických aktivit	62
4.2.1	Chemikálie pro stanovení biologických aktivit	62
4.2.2	Pufry	63
4.2.3	Přístroje	63
4.2.4	Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE	64
4.2.5	Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči POP	64
4.3	Metody	64
4.3.1	Obecné postupy	64
4.3.2	Metody použité pro strukturní identifikaci izolovaných alkaloidů	66
4.4	Studium biologické aktivity izolovaných alkaloidů	69
4.4.1	Stanovení inhibiční aktivity vůči humánním cholinesterázám	69
4.4.2	<i>In silico</i> studie	71
4.4.3	Stanovení inhibiční aktivity vůči prolyloligopeptidase	71
4.4.4	Predikce průchodu látek přes hematoencefalickou bariéru	71
4.4.5	Stanovení cytotoxické aktivity <i>in vitro</i>	72
4.5	Rostlinný materiál	72
4.6	Izolace alkaloidů	72
4.6.1	Izolace látek ze spojených alkaloidních frakcí	76
5	VÝSLEDKY	83
5.1	GC/MS analýza alkaloidního extraktu <i>Zephyranthes citrina</i>	83
5.2	Alkaloidy izolované ze <i>Zephyranthes citrina</i> a jejich strukturní analýza	85
5.2.1	ZC-1: Galanthin	85
5.2.2	ZC-2: Buphanisin	86
5.2.3	ZC-3: 6 α -Ethoxyhippeastidin	87
5.2.4	ZC-4: 10-Deoxy-6 α -ethoxyhippeastidin	88
5.2.5	ZC-5: Nerinine	89
5.2.6	ZC-6: Narcieliin	90
5.2.7	ZC-7: Haemanthamin	92
5.2.8	ZC-8: Zephyjanin	93
5.2.9	ZC-9: Zephycitrin I	95
5.2.10	ZC-10: Tazettin	96
5.2.11	ZC-11: Maritidin	97
5.2.12	ZC-12: Vittatin	98
5.2.13	ZC-13: Narcissidin	99
5.2.14	ZC-14: Methylpseudolykorin	100

5.2.15	ZC-15: Dihydromaritidin	101
5.2.16	ZC-16: 7-Ethoxy-10-methoxy-1-methyllykorenan-9-ol	102
5.2.17	ZC-17: 1- <i>O</i> -Acetylkararin	103
5.2.18	ZC-18: Haemanthidin	104
5.2.19	ZC-19: Lykorin.....	105
5.2.20	ZC-20: 10-Deoxy-6-hydroxyhippeastidin	106
5.2.21	ZC-21: 6-Hydroxyhippeastidin	107
5.2.22	ZC-22: 8- <i>O</i> -Demethylmaritidin.....	108
5.2.23	ZC-23: Lykoramin.....	109
5.2.24	ZC-24: 9- <i>O</i> -Demethylgalanthin	110
5.2.25	ZC-25: Zephycitrin II	111
5.2.26	ZC-26: 9- <i>O</i> -Demethylhomolykorin	112
5.2.27	ZC-27: Tortuosin	113
5.3	Výsledky biologických testů izolovaných alkaloidů	115
5.3.1	Inhibiční aktivita alkaloidů vůči enzymům ve vztahu k Alzheimerově chorobě	115
5.3.2	Kinetická studie inhibice <i>h</i> AChE a <i>h</i> BuChE narcieinu	116
5.3.3	PAMPA-BBB (Parallel artificial membrane permeation assay).....	116
5.3.4	Výsledky stanovení cytotoxického působení izolovaných alkaloidů.....	118
6	DISKUSE.....	120
7	ABSTRAKT	126
8	ABSTRACT.....	128
9	PŘEHLED PUBLIKACÍ A KONFERENCÍ	130
9.1	Původní práce	130
9.2	Konference.....	132
9.2.1	Přednášky	132
9.2.2	Posterové prezentace	132
9.3	Účelová finanční podpora.....	133

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAs	Amaryllidaceae alkaloidy
A2780	buněčná linie karcinomu vaječníku
A549	buněčná linie adenokarcinomu plic
AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
APP	amyloidní prekurzorový protein
A β	β -amyloid
A β 40	β -amyloid o délce 40 aminokyselin
A β 42	β -amyloid o délce 42 aminokyselin
BACE1	β -sekretáza
BuChE	butyrylcholinesteráza
Caco-2	buněčná linie kolorektálního karcinomu
CNS	centrální nervová soustava
CTF	C-terminální fragment APP
β -CTF	C-terminální fragment APP po štěpení β -sekretázou
cv.	pěstovaná odrůda
DAD	detektor s diodovým polem
3,4-DHBA	3,4-dihydroxybenzaldehyd
<i>EeAChE</i>	acetylcholinesteráza z elektrického úhoře
EI	elektronová ionizace
ESI	ionizace elektrosprejem
FHS 74Int	buněčná linie zdravých epiteliálních buněk tenkého střeva
GBP	1- <i>O</i> -(3- <i>O</i> - β -D-glukopyranosylbutyryl)pankratistatin
GC	plynová chromatografie
gCOSY	gradient correlation spectroscopy (NMR metoda)
GSK-3 β	glykogen syntáza kináza-3 β
HBP	1- <i>O</i> -(3-hydroxybutyryl)pankratistatin
HEB	hematoencefalická bariéra
<i>hAChE</i>	humánní acetylcholinesteráza
<i>hBuChE</i>	humánní butyrylcholinesteráza
HT-29	buněčná linie kolorektálního karcinomu

HeLa	buněčná linie adenokarcinomu děložního čípku
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
ChAT	cholinacetyltransferáza
Jurkat	buněčná linie akutní leukémie T lymfocytů
MCF-7	buněčná linie adenokarcinomu prsu
MCF-7	buněčná linie adenokarcinomu prsu
MOLT-4	buněčná linie akutní lymfoblastické leukémie
MRC-5	buněčná linie zdravých plicních fibroblastů
MS	hmotnostní spektrometrie
NFTs	neurofibrilární klubka
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartátové receptory
NMR	nukleární magnetická rezonance
NOESY	nuclear overhauser effect spectroscopy (NMR metoda)
PANC-1	buněčná linie epiteliálního karcinomu slinivky
PAL	fenylalanin-lyáza
PAMPA-BBB	parallel artificial membrane permeability assay- blood brain barrier (metodika pro predikci průchodu látek přes HEB prostou difúzí)
POP	prolylologopeptidáza
sAPP α	solubilní fragmenty APP po štěpení α -sekretázou
sAPP β	Solubilní fragmenty APP po štěpení β -sekretázou
SAOS-2	buněčná linie osteosarkomu
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TOF	analyzátor doby letu
TYDC	tyrosin-dekarboxyláza
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

1 ÚVOD

Látky přírodního původu se v péči o zdraví uplatňovaly od nepaměti a po velmi dlouhou dobu představovaly jediný prostředek pro léčbu zdravotních potíží. První písemná zmínka o použití rostlin k přípravě léčiv byla nalezena na sumerské hliněné destičce staré asi 5000 let. Dochované písemnosti z období starověkých civilizací (Mezopotámie, Egypt, Čína, Indie) svědčí o velmi rozvinutém používání látek přírodního původu v terapii, dokládají to i díla antických autorů a bohatá literatura středověku a novověku¹⁻³. Jedním z klíčových momentů byl přelom 18. a 19. století, kdy byly izolovány první přírodní látky. Lékárník F. W. A. Sertürner objevil morfin a mekonovou kyselinu, profesor chemie J. B. Caventou spolu s lékárníkem J. Pelletierem izolovali chinin, cinchonin, brucin a strychnin. Univerzitní lékárník v Heidelbergu P. L. Geiger a chemik O. Hesse společně získali atropin, hyoscyamin, kolchicin a akonitin². S nárůstem znalostí o složení, účincích a použití přírodních léčiv, souhrnně označovaných jako „materia medica“, se začal formovat samostatný vědní obor, jehož název „farmakognozie“ se poprvé objevil v učebnici „Lehrbuch der Materia Medica“ Johanna Adama Schmidta, profesora obecné patologie, terapie a „materia medica“ na Vídeňské medicínsko-chirurgické akademii³⁻⁵.

V současnosti se lze setkat s některými názory, že farmakognozie, jakožto nejstarší profilový obor farmacie, je disciplínou překonanou a pro farmacii bezobsažnou, protože tzv. léčivá rostlina už nemá v době pokročilé syntetické chemie nových léčiv význam⁶. V této souvislosti je vhodné uvést, že nezanedbatelné procento světové populace je i v dnešní době odkázáno na rostlinná léčiva tradiční medicíny pro primární formu zdravotní péče³. Reálné uplatnění léčiv sledované v letech 1981-2006 odhalilo, že 63 % léčiv charakteru malých molekul má svůj původ v přírodních látkách. Přičemž 6 % těchto léčiv má původ v přírodních látkách samotných, 28 % ve formě sloučenin připravených z přírodních předloh, 12 % syntetických léčiv vzniklo na základě screeningu nebo modifikací již existujících přírodních léčiv s charakterem mimik přírodních látek a 12 % syntetických látek, jejichž farmakofor vychází z přírodní předlohy. Lze předpokládat, že tento trend bude pokračovat i v budoucnu při hledání nových léčiv pro terapii rozličných onemocnění (např. nádorová onemocnění, neurodegenerativní choroby, infekční onemocnění)⁶. Dalším faktem je, že více než 95% světové biodiverzity nebylo dosud posuzováno z hlediska jakékoli biologické aktivity, je tedy výzvou, jak co nejúčinněji zhodnotit tento obrovský přírodní rezervoár potenciálních léčiv⁷. Rostliny čeledi Amaryllidaceae byly jako součást tradiční medicíny využívány tisíce let. První důkaz o léčebném využití těchto rostlin je datován do 4. stol. př. n. l., kdy Hippokratés z Kósu

doporučoval olejovou emulzi z *Narcissus poeticus* k léčbě nádorů dělohy⁸. Dlouhou historii má i rostlina *Lycoris radiata*, jež byla používána jako součást tradiční čínské medicíny k léčbě nádorových onemocnění. Obdobným způsobem využívali Mayové různé části rostliny *Hymenocallis littoralis*. Z čeledi Amaryllidaceae byla izolována celá řada sekundárních metabolitů (chalkony, flavonoidy, lektiny, lignany, terpenoidy), ale nejvýznamnější a intenzivně studované jsou právě Amaryllidaceae alkaloidy (AAs, také označované jako amarylkovité alkaloidy), které zodpovídají za většinu biologických účinků těchto rostlin⁹. Nejznámějším AAs je galanthamin. Tento inhibitor acetylcholinesterázy, multimiliardový lék na léčbu Alzheimerovy choroby, byl původně izolován ze sněženky *Galanthus woronowii*, která se využívala v lidovém léčitelství v některých oblastech Kavkazu. Po úspěchu galanthaminu na poli neurodegenerativních onemocnění výrazně vzrostl zájem o tuto skupinu látek. Řada výzkumných skupin navíc přihlédla k používání těchto rostlin v lidovém léčitelství a začala tyto látky zkoumat jako možná protinádorová léčiva. Na základě studií posledních let jsou nejslibnějšími amarylkovitými alkaloidy ve vztahu k maligním onemocněním alkaloidy narciklasinového, lykorinového, krininového a haemanthaminového strukturního typu⁹. Kromě inhibice acetylcholinesterázy a protinádorových účinků vykazují amarylkovité alkaloidy celou řadu dalších biologických aktivit: antibakteriální, antivirové, antifungální, animalarické, protizánětlivé a analgetické. Toto portfolio biologických aktivit se v poslední době ještě rozšířilo. Poměrně nedávno bylo zjištěno, že montanin izolovaný z *Rodophiala bifida*, vykazuje antirevmatické účinky. Dá se tedy očekávat, že do budoucna může být těmto látkám věnována pozornost jako možným léčivům v onemocněních autoimunitního systému¹⁰.

Tato doktorská disertační práce se zabývá izolací, strukturní identifikací a biologickou aktivitou alkaloidů izolovaných z cibulí rostliny *Zephyranthes citrina* Baker. Rostlina byla pro fytochemickou studii vybrána na základě literární rešerše (dosud bylo z tohoto druhu izolováno pouze 9 alkaloidů), GS/MS analýzy a následného screeningu biologických aktivit alkaloidního extraktu. Cílem bylo vybrat takovou rostlinu, která bude zdrojem širokého spektra alkaloidů a alkaloidů dosud nepopsaných, a to v takových množstvích, která umožní provedení biologických testů, jež souvisí s Alzheimerovou chorobou a nádorovými onemocněními. Dalším záměrem bylo vytipovat látky pro podrobnější biologické studie a pro přípravu polosyntetických derivátů těchto látek.

2 CÍL PRÁCE

Cílem disertační práce byla izolace alkaloidů z čerstvých cibulí druhu *Zephyranthes citrina* Baker z čeledi Amaryllidaceae za účelem jejich strukturní identifikace a testování jejich biologických aktivit.

Dílčí cíle práce:

- zpracování literární rešerše zabývající se výskytem alkaloidů v rámci rodu *Zephyranthes* a jejich biologickou aktivitou,
- izolace co největšího počtu alkaloidů z extraktu připraveného z čerstvých cibulí *Zephyranthes citrina*,
- určení struktury izolovaných látek na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností (NMR, MS, X-ray, optická otáčivost),
- studium biologických aktivit izolovaných alkaloidů v souvislosti s možnou terapií Alzheimerovy choroby (inhibice lidských cholinesteráz, inhibice prolyloligopeptidázy) a nádorových onemocnění (studium na panelu nádorových buněk),
- výběr látek pro přípravu polosyntetických derivátů za účelem rozšíření portfolia testovaných látek,
- výběr látek perspektivních pro další a podrobnější biologické studie,
- sběr, analýza a vyhodnocení dosažených výsledků, sepsání a obhájení disertační práce.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Rostliny čeledi Amaryllidaceae

3.1.1 Taxonomické řazení a klasifikace¹¹

Říše: rostliny (Plantae)

Podříše: cévnaté rostliny (Tracheophyta)

Oddělení: krytosemenné (Magnoliophyta)

Třída: jednoděložné (Liliopsida)

Řád: chřestotvaré (Asparagales)

Čeleď: amarylkovité (Amaryllidaceae)

Rostliny čeledi Amaryllidaceae jsou taxonomicky řazeny do tří podčeledí (Agapanthoideae, Allioideae, Amaryllidoideae)¹², čeleď zahrnuje přibližně 1100 druhů rostlin klasifikovaných do asi 75 rodů¹³. Jedná se o vytrvalé, většinou suchozemské byliny s podzemní cibulí, řidčeji oddenkem. Rostliny jsou rozšířené po celé zeměkouli, především však v tropech a subtropích, centrum jejich diverzity se nachází v jižní Americe a Jižní Africe. Na našem území se můžeme běžně setkat se zástupci rodu: sněženka (*Galanthus*), bledule (*Leucojum*) a narcis (*Narcissus*)¹⁴ (Obr. 1). Celá řada těchto rostlin je pěstována pro okrasné účely (např. *Agapanthus*, *Amaryllis*, *Brunsvigia*, *Clivia*, *Eucharis*, *Hippeastrum*, *Lycoris*, *Nerine*, *Scadoxus* a další)¹⁵.



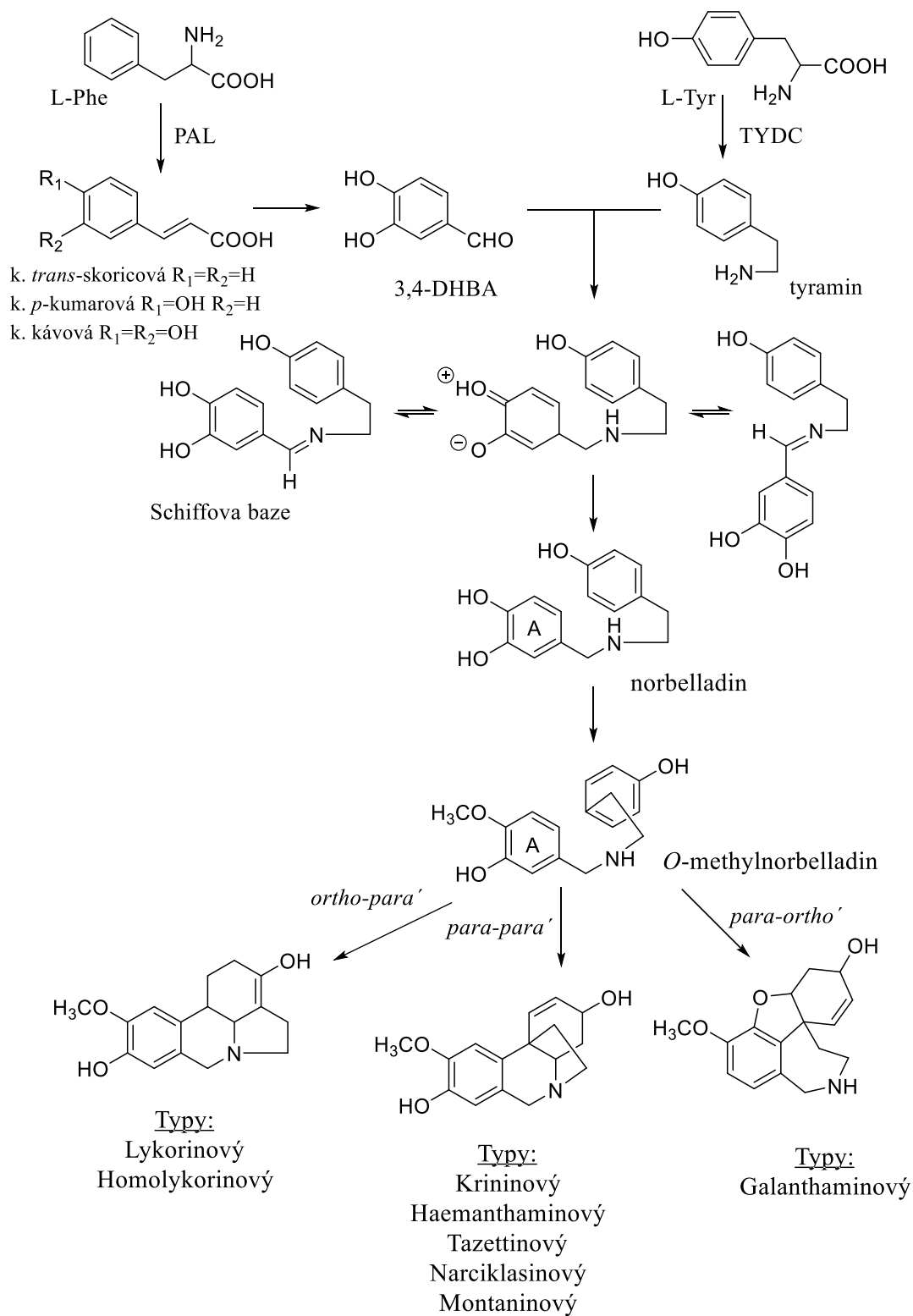
Obrázek 1: Rostliny čeledi Amaryllidaceae, zleva *Narcissus orientalis*¹⁶, *Galanthus elwesii*¹⁶, *Leucojum aestivum*¹⁷

Tyto rostliny poutají pozornost vědecké komunity především díky obsahu biologicky aktivních a strukturně jedinečných alkaloidů, které byly izolovány z rostlin všech rodů podčeledi Amaryllidoideae. Tyto sloučeniny jsou označovány jako Amaryllidaceae alkaloidy (česky amaryllkovité alkaloidy) a představují rozsáhlou a stále rostoucí skupinu izochinolinových alkaloidů, které vykazují celou řadu biologických účinků. Literatura popisuje účinky cytotoxické, antifungální, antibakteriální, antivirotické, antiprotozoální a inhibiční účinek vůči cholinesterázám⁸.

3.1.2 Charakteristika amaryllkovitých alkaloidů a jejich biosyntéza

Fyzikálně-chemické charakteristiky AAs lze shrnout v několika bodech. Základní cyklická struktura tvořená uskupením C6–C1 a N–C2–C6 je odvozena od aminokyselin L-fenylalaninu a L-lysinu, které představují výchozí látky celé biosyntézy. Alkaloidy mají charakter slabých bází, jejichž pKa se pohybuje v rozmezí hodnot 6-9. Většina doposud izolovaných AAs obsahuje jeden atom dusíku, který je sekundární, terciární nebo kvartérní¹⁸. Výjimku představují alkaloidy izolované v posledních letech, které jsou kombinací dvou strukturních typů. V jejich struktuře je možné nalézt dva atomy dusíku, příkladem takové struktury je pallidiflorin^{19, 20}.

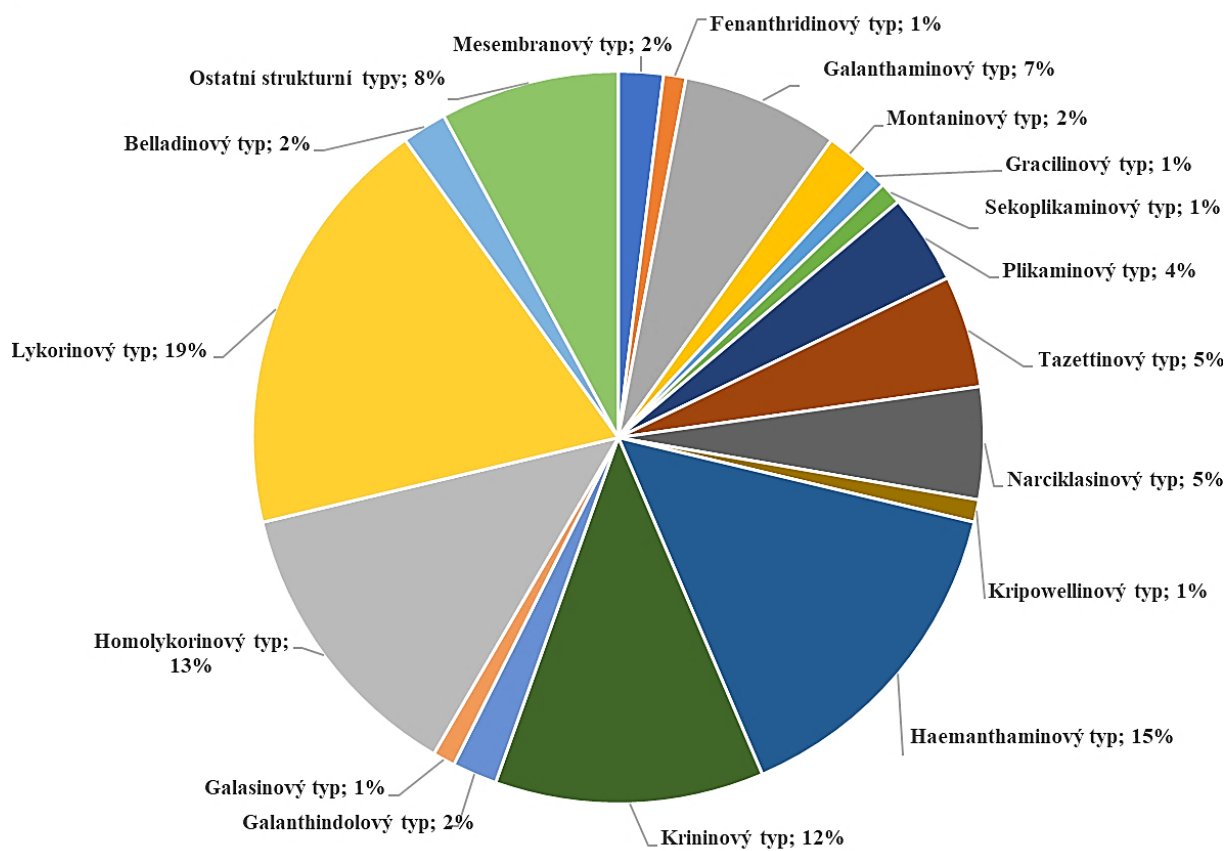
Jak již bylo zmíněno výše, biosyntéza AAs (Obr. 2) vychází z aromatických aminokyselin L-fenylalaninu a L-lysinu²¹. I když se jedná o aminokyseliny strukturně blízké, nejsou v průběhu biosyntézy zaměnitelné. Na počátku dochází k enzymatické přípravě prekurzorů. Modifikace L-fenylalaninu je katalyzována fenylalanin-lyázou (PAL) za vzniku *trans*-skořicové kyseliny. Následují dva hydroxylační kroky, během nichž dochází ke ztrátě dvou atomů uhlíku a vzniká 3,4-dihydroxybenzaldehyd (3,4-DHBA). Současně je dekarboxylován L-tyrosin tyrosin-dekarboxylázou (TYDC) na tyramin^{18, 21}. Z tyraminu a 3,4-DHBA vzniká meziprodukt norbelladin, po kterém byla tato biosyntetická dráha pojmenována. Jakmile je kruh A norbelladinu chráněn methylací (*O*-methylnorbelladin), může dojít k intramolekulárnímu oxidativnímu spojení, které umožňuje vznik AAs různých strukturních typů. Podle způsobu tohoto spojení (*ortho-para'*, *para-ortho'*, *para-para'*) vzniká devět základních skeletů. Jedná se o tyto strukturní typy: lykorinový (hlavní zástupce lykorin), galanthaminový (galanthamin), tazettinový (tazettin), pankratistatinový (pankratistatin), homolykorinový (homolykorin), krininový (krinin), haemanthaminový (haemanthamin) a belladinový typ, který je současně meziproduktem biosyntézy. Kroky vedoucí k montaninovému strukturnímu typu (montanin) nebyly dosud uspokojivě vysvětleny^{12, 21}.



Obrázek 2: Schéma biosyntézy devíti základních strukturálních typů Amaryllidaceae alkaloidů

3.1.3 Strukturní typy amarylkovitých alkaloidů

Od izolace prvního alkaloidu lykorinu uplynulo téměř 150 let, za tu dobu bylo izolováno více než 600 amarylkovitých alkaloidů²², většinu z nich lze zařadit do devíti základních strukturních typů, které jsou popsány výše²¹. Vedle těchto devíti základních skeletů literatura popisuje řadu dalších strukturních typů AAs, které byly izolovány v některých rodech podčeledi Amaryllidoideae²². Většina těchto látek se ale v rostlinách vyskytuje pouze ve velmi nízkých nebo stopových koncentracích. Mezi takovéto strukturní typy patří např. plikaminový, sekoplikaminový nebo galasinový strukturní typ (Obr. 3).

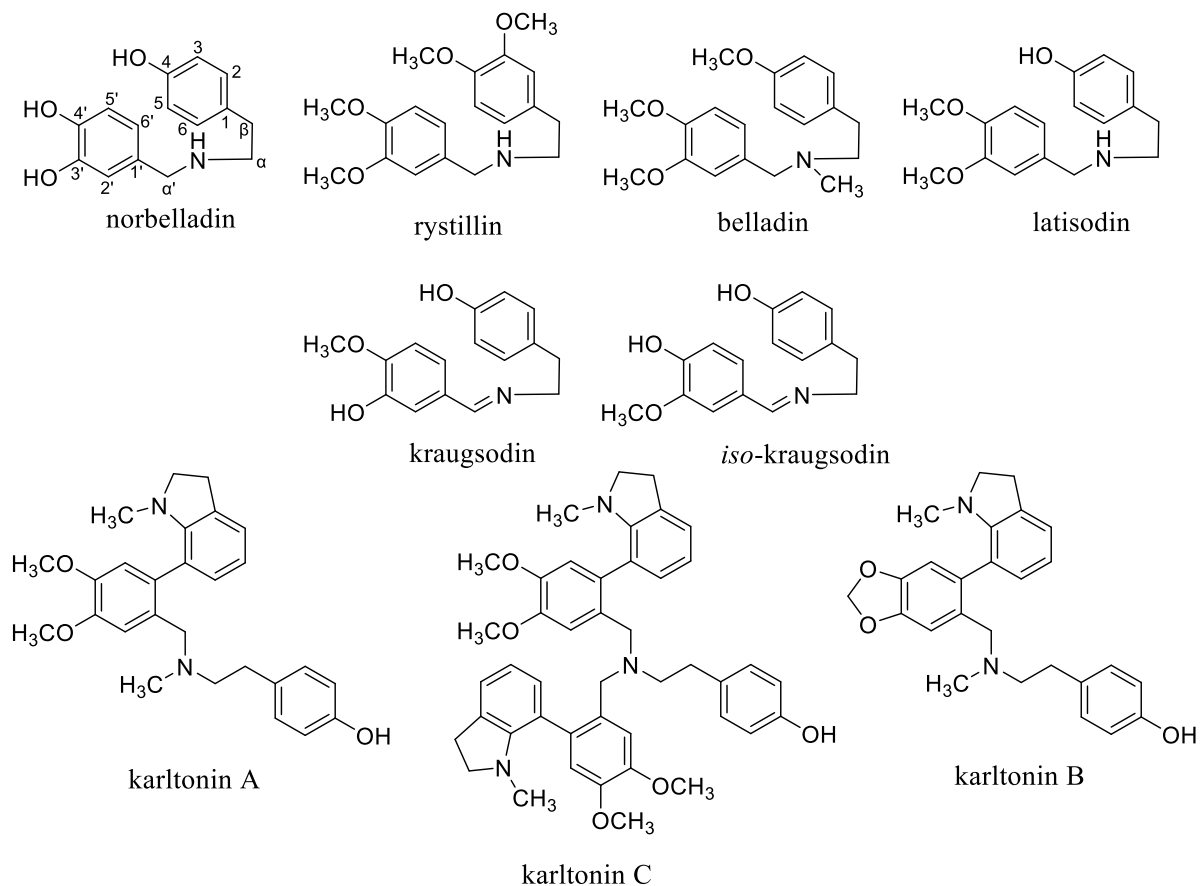


Obrázek 3: Distribuce strukturních typů Amaryllidaceae alkaloidů²²

3.1.3.1 Základní strukturní typy Amaryllidaceae alkaloidů

Norbelladin je meziproductem a současně prvním alkaloidem biosyntetické dráhy vedoucí k AAs. Kostru těchto alkaloidů tvoří *N*-benzylfenethylamin. Alkaloidy belladinového strukturního typu byly izolovány napříč rody *Crinum*, *Nerine* a *Pancratium*. Příkladem těchto látek je rystillin, belladin, latisodin nebo latisolin²² (Obr. 4). K tomuto strukturnímu typu lze zařadit také kraugsodin a isokraugsodin, představitele konkrétních Schiffových bází izolovaných z několika druhů křínu (*Crinum*)^{23, 24}. Tato izolace dokazuje existenci Schiffových

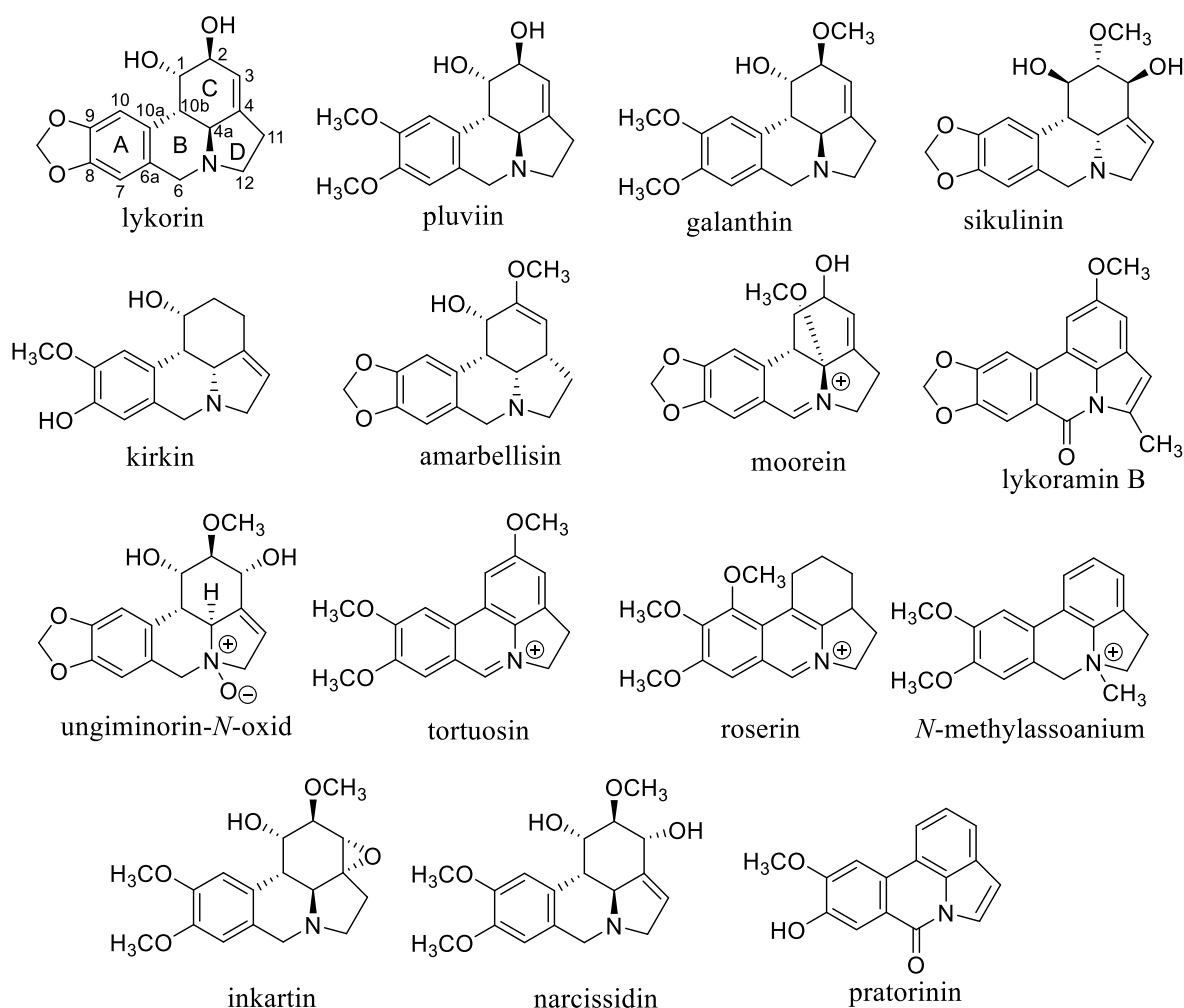
bazí v přírodě a současně potvrzuje správnost hypotézy, ze které je odvozena celá biosyntéza²⁵. V rámci studie z roku 2020 byly izolovány dimerní alkaloidy vycházející z belladinového strukturního typu. Tyto alkaloidy, nazvané karltonin A, B a C, kombinují ve své struktuře belladinový a galanthindolový skelet. Tyto nové struktury jsou někdy označovány jako alkaloidy karltoninového strukturního typu²⁶. Všechny uvedené struktury jsou shrnuty v následujícím obrázku (Obr. 4).



Obrázek 4: Vybrané alkaloidy norbelladinového a karltoninového strukturního typu

Alkaloidy lykorinového typu tvořené pyrrolo[d,e]phenanthridinem představují nejrozmanitější skupinu mezi AAs. Dosud bylo izolováno kolem 120 alkaloidů tohoto strukturního typu²². Podle uspořádání kruhů B/C rozlišujeme čtyři možné stereoizomery (lykorany), u většiny struktur nacházíme kruhy B/C v uspořádání *trans* (α - a β -lykorany). Existují však i výjimky s uspořádáním kruhů *cis*-B/C (γ - a δ -lykorany), příkladem jsou kirkin, sikulinin nebo amarbellisin^{22, 27}. Tento strukturní typ je možné rozdělit na dva podtypy: i) alkaloidy lykorinového strukturního typu nesoucí methyldioxalanový kruh na uhlících C8 a C9 a ii) alkaloidy lykorinového strukturního typu bez methyldioxalanového kruhu na uhlících C8 a C9, v tomto případě jsou pozice obvykle substituovány hydroxy- popřípadě methoxy-skupinami (galanthin, pluviin). Běžná je také dvojná vazba mezi uhlíky C3 a C4 v kruhu D

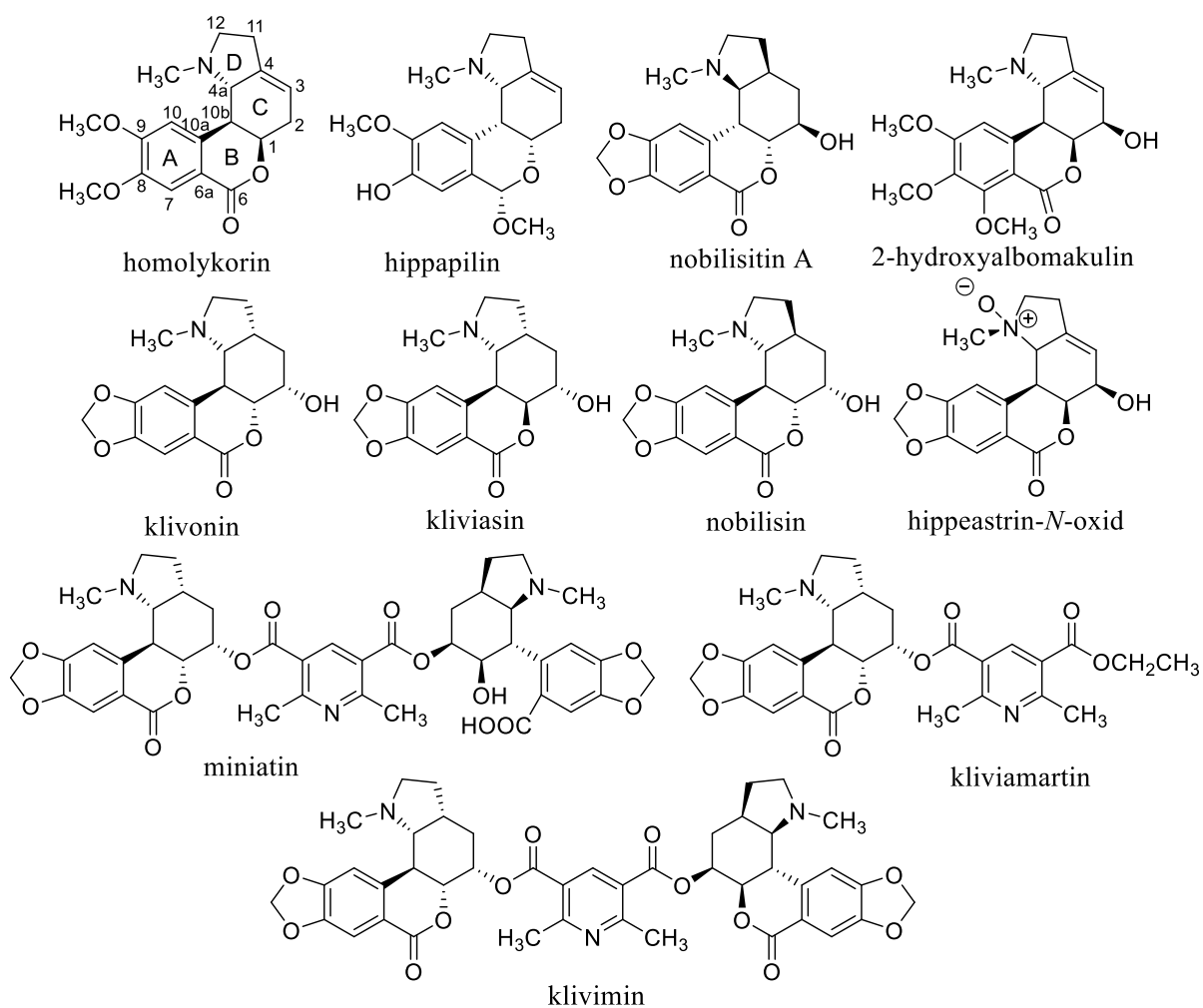
(lykorin), na uhlících C1 a C2 jsou pak přítomny různé substituenty²². Jediným lykorinovým alkaloidem se substituentem na uhlíku C4a je moorein (methoxy- skupina)²⁸, lykoramin B představuje jediný alkaloid lykorinového typu se substitucí na C12 (methylová skupina)²⁹. Netypickou molekulou je dále 8-hydroxylykorin-7-on, který má karbonylovou skupinu na uhlíku C6. V literatuře byly také popsány *N*-oxidy lykorinového typu (ungiminorin-*N*-oxid), kvartérní alkaloidy s imino- skupinou (roserin, tortuosin) a látky, které mají substituovaný atom dusíku methylovou skupinou (*N*-methyllassoanium)²². Z rostlin byly izolovány i alkaloidy, u nichž jsou dvojně vazby mezi uhlíky C3 a C4 nahrazeny epoxy- skupinami (inkartin) nebo mají dvojnou vazbu mezi uhlíky C4 a C11 (narcissidin). U některých zástupců můžeme nalézt aromatický kruh C (pratorinin)²². Diskutované struktury jsou shrnuty v následujícím obrázku (Obr. 5).



Obrázek 5: Vybrané alkaloidy lykorinového strukturního typu

Prozatím bylo izolováno a strukturně popsáno asi 80 alkaloidů homolykorinového strukturního typu. Tyto alkaloidy, jež jsou odvozeny od benzopyrano-indolu, můžeme rozdělit do dvou

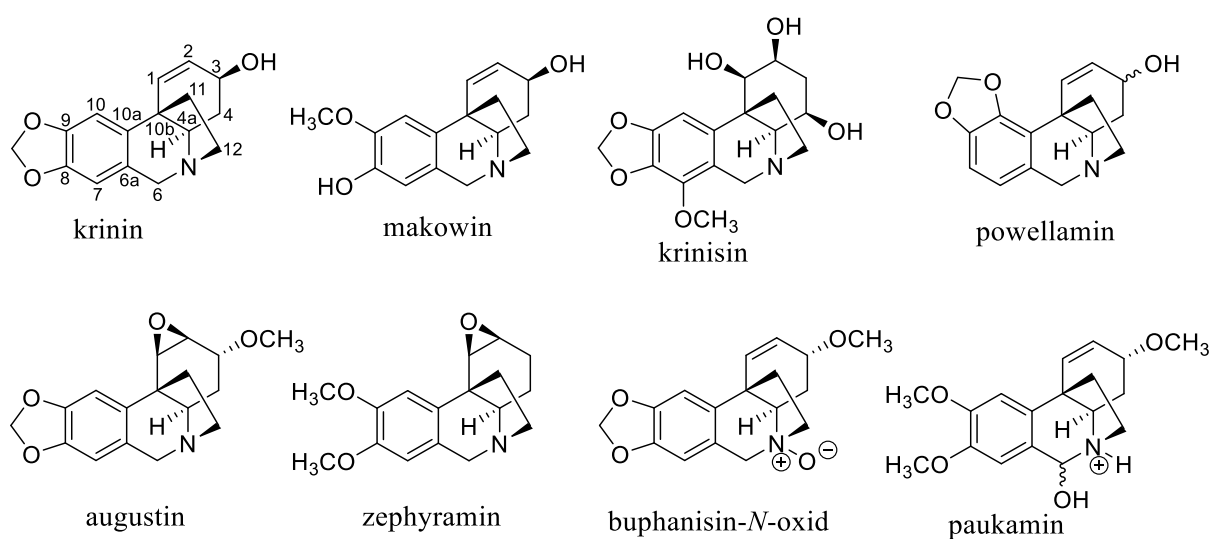
podskupin na základě nasycení vazby mezi uhlíky C3 a C4. Většina těchto látek, včetně homolykorinu, má dvojnou vazbu mezi uhlíky C3 a C4, *cis* uspořádání mezi kruhy B/C a vodíky na C1 a C10b v α -orientaci²². Strukturální výjimky představují hippapilin a nobilisitin A, kde vodíky na C1 a C10b zaujímají β -orientaci^{22,30}. Vodíky na C4a a C2 se obvykle nachází v pozici α , existují však i látky, které se vymykají tomuto pravidlu (2 β -hydroxyalbomakulin)²². U alkaloidů s nasycenou vazbou mezi uhlíky C3 a C4 rozlišujeme tři možné řady stereoizomerů podle prostorové orientace kruhů: *trans*-B/C a *cis*-C/D (klivonin), *cis*-B/C and *cis*-C/D (kliviasin), *trans*-B/C a *trans*-C/D (nobilisin)³¹. Sloučeniny s nasycenou vazbou mezi uhlíky C3 a C4 se vyskytují velmi vzácně, převážně v rodu *Clivia*. Uhlíky C2, C7 a C10 jsou běžně substituovány hydroxy- nebo methoxy- skupinou, poloha C6 je substituována karbonylovou skupinou, uhlíky C8 a C9 jsou spojeny methyldioxalanovým kruhem nebo nesou hydroxy- popřípadě methoxy- skupiny, dusík bývá většinou methylován²². U tohoto strukturálního typu jsou známy i dimerní struktury (klivimin, miniatin a kliviamartin) a látky typu *N*-oxidů (hippeastrin-*N*-oxid)^{22,32}. Uvedené struktury jsou shrnuty na následujícím obrázku (Obr. 6).



Obrázek 6: Vybrané alkaloidy homolykorinového strukturálního typu

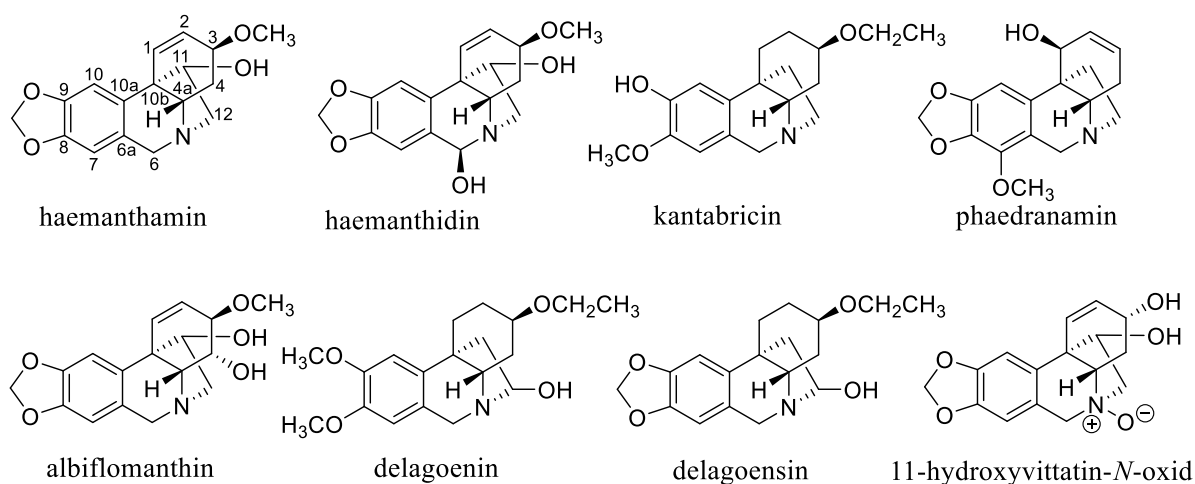
Alkaloidy krininového a haemanthaminového strukturního typu jsou odvozeny od 5,10*b*-ethanophenanthridinu. Hlavní charakteristikou těchto alkaloidů je přítomnost ethanového můstku, který přemostňuje molekulu v polohách N-5 a C-10*b*. Ethanový můstek se vyskytuje buď v absolutní konfiguraci alfa (α -krinany), pak se jedná o haemanthaminový typ AAs (hlavním představitelem je haemanthamin), nebo v konfiguraci beta (β -krinany), pak jde o alkaloidy krininového strukturního typu (hlavním představitelem je krinin)³³. Dosud je známo asi 85 alkaloidů krininového a téměř 80 alkaloidů haemanthaminového strukturního typu. Strukturní rozmanitost těchto látek vychází z rozličných kombinací substituentů na téměř všech atomech uhlíku, ze stupně aromatizace kruhu C a v neposlední řadě z různých možností prostorového uspořádání molekul, které je umožněno přítomností chirálních atomů uhlíku (C1, C2, C3, C6 a C11)²².

U alkaloidů krininového strukturního typu je molekula nejčastěji substituována v pozicích C1, C2, C3 hydroxy-, methoxy- nebo acetoxy- skupinami²². V rámci fytochemických studií byly izolovány i látky se substitucí na C4 (krinisin)³⁴. Alkaloidy se substitucí na uhlíku C6 se nachází ve směsi epimerů. Na rozdíl od alkaloidů haemanthaminového typu můžeme téměř u poloviny alkaloidů typu krininu nalézt substituent v pozici C7 (Obr. 7). Dalším typickým rysem je přítomnost dioxalanového kruhu na uhlících C8 a C9 (krinin), případně hydroxy- nebo methoxy- skupin (makowin). Strukturní zvláštnost představuje alkaloid izolovaný z *Crinum powellii* Hort. s methyldioxalanovým kruhem na uhlících C9 a C10 (powellamin)^{22,35}. V některých případech byly popsány i struktury s epoxy- skupinou mezi uhlíky C1 a C2 (augustin, zephyramin)^{36,37}, *N*-oxidy (buphanisin-*N*-oxid)³⁸ a kvartérní alkaloidy (paukamin)³⁹.



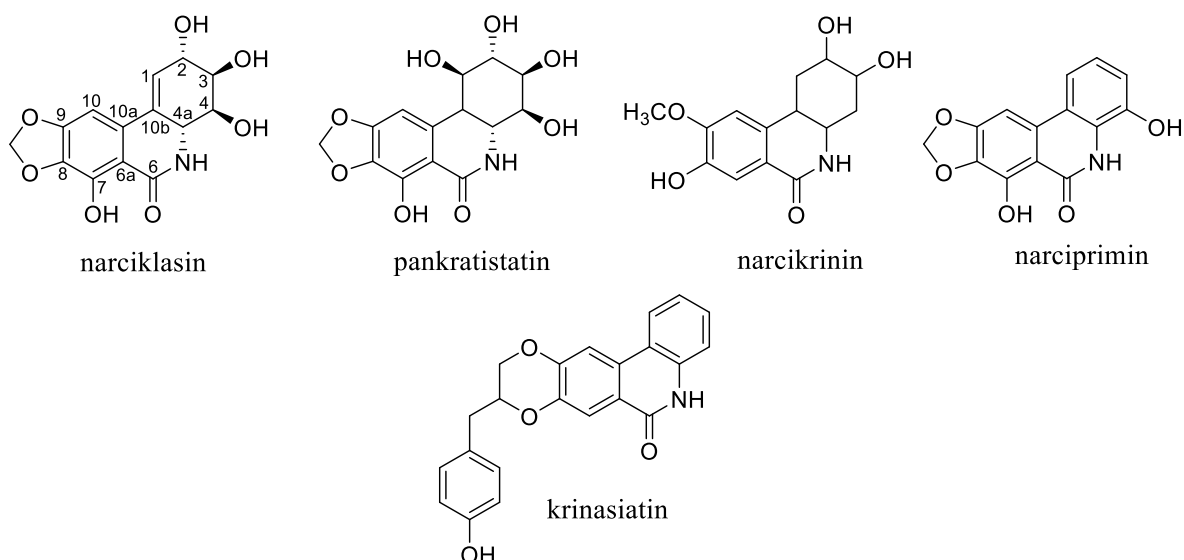
Obrázek 7: Vybrané alkaloidy krininového strukturního typu

Alkaloidy haemanthaminového typu jsou substituovány nejčastěji na uhlících C3, C6 a C11 hydroxy-, methoxy- a acetoxy- skupinami. Mezi izolovanými látkami dosud nebyla nalezena struktura haemanthaminového typu se substituentem na C2 a byl popsán pouze jeden alkaloid se substitucí na uhlících C1 a C7 (phaedranamin). Substituce na C6, C8 a C9 je u haemanthaminové řady podobná alkaloidům krininového strukturního typu. Nejčastějším substituentem na uhlíku C11 je hydroxy- skupina, nicméně byly izolovány i látky s methoxy-, acetoxy- a hydroxybutanoyl- substituentem v poloze C11. Otázkou je, zda se v případě hydroxybutanoylové substituce jedná o přírodní látku nebo izolační artefakt²². Z rostliny *Haemanthus albiflos* (Jacq.)⁴⁰ byla izolována struktura s hydroxy- skupinou na C4 (albiflomanthin)³⁴. Delagoenin a delagoensin jsou jediné dva alkaloidy tohoto typu se substitucí na uhlíku C12⁴¹ (Obr. 8).



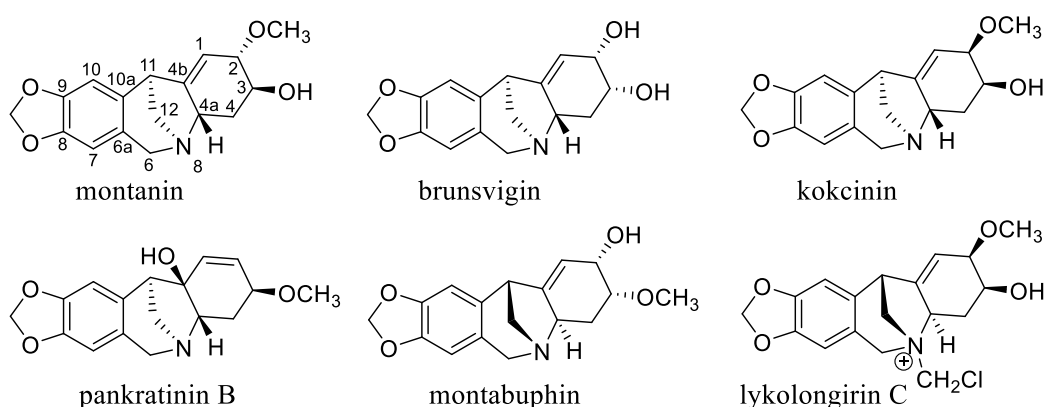
Obrázek 8: Vybrané alkaloidy haemanthaminového strukturního typu

Prvním popsáným alkaloidem narciklasinového strukturního typu byl narciklasin izolovaný z několika druhů rodu *Narcissus* roku 1967. Tyto alkaloidy obsahují ve své struktuře fenanthridin a isokarbostyryl (1-hydroxyisochinolin), dusík těchto alkaloidů je součástí amidové skupiny, proto mají slabě kyselý charakter⁴². Dosud bylo identifikováno kolem 30 alkaloidů narciklasinového typu. Alkaloidy typu narciklasinu jsou běžně substituovány hydroxy-, methoxy-, hydroxybutanoyl- a glukosyl- skupinami na uhlících C1, C2, C3, C4, C7 a C10b (Obr. 9). Převážná většina těchto alkaloidů byla izolována z různých druhů rodů *Lycoris*, *Sternbergia*, *Hymenocallis*, *Zephyranthes*, *Habranthus* a *Pancreatium*²². Alkaloidy narciklasinového typu jsou intenzivně studované z pohledu možné protinádorové aktivity. Vzhledem k tomu, že se v rostlinném materiálu nacházejí jen v nízkých koncentracích, byly navrženy i totální syntézy těchto látek⁴³⁻⁴⁵.



Obrázek 9: Vybrané alkaloidy narciklasinového strukturního typu

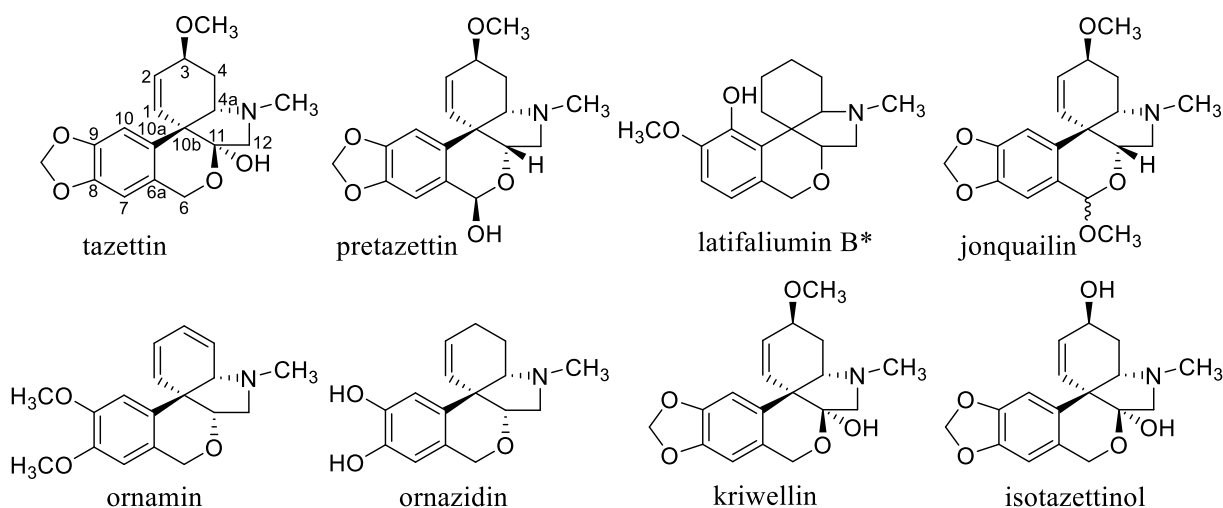
Základní struktura alkaloidů montaninového typu je tvořena 5,11-methanomorphanthridinovým skeletem. Většina těchto látek má 5,11-methanový můstek v α -konfiguraci a vodík na uhlíku C4a v β -konfiguraci. Montabuphin a lykolongirin C jsou jediné dva alkaloidy typu montaninu s popsanou β -orientací 5,11-methanového můstku (Obr. 10). V literatuře se diskutuje, zda se opravdu jedná o přírodní látky. V některých pracích je uváděno, že by se mohlo jednat o izolační artefakty. Strukturní variabilita alkaloidů tohoto typu je dána substitucí na uhlících C2, C3, C4 a C4b (hydroxy- a methoxy- skupiny). Alkaloidy montaninového strukturního typu byly popsány v rodech *Lycoris*, *Pancreatum*, *Narcissus*, *Haemanthus* a *Hippeastrum*²².



Obrázek 10: Vybrané alkaloidy montaninového typu

Do dnešní doby bylo izolováno přes 30 alkaloidů tazettinového strukturního typu, u kterých je základní kostra tvořena benzopyranovým kruhem. Dvojná vazba mezi uhlíky C1 a C2 je poměrně běžná, existují však i výjimky (latifaliumin B). Uhlíky C8 a C9 jsou obvykle spojeny

dioxalanovým kruhem (jonquailin), byly popsány i alkaloidy s hydroxy- nebo methoxy-skupinami na těchto uhlících (ornamin, ornazidin)²². Bylo publikováno, že tazettin vzniká v bazickém prostředí intramolekulárním přeskupením pretazettinu, v případě této látky by se na základě tohoto tvrzení mělo jednat o izolační artefakt. Z těchto důvodů je pretazettin v poslední době upřednostňován jako reprezentativní zástupce této skupiny alkaloidů (pretazettinový strukturní typ)^{22, 46}. V rostlinách je ale oproti tazettinu přítomný pouze ve stopových koncentracích. U alkaloidů s pozměněnou stereochemií tazettinové kostry by bylo vhodné ověřit, zda se skutečně vyskytují přirozeně nebo se jedná o artefakty izolačního procesu jako v případě tazettinu (kriwellin, isotazettinol). Stejně tak je diskutabilní přirozený výskyt ethoxy- derivátů AAs²² (Obr. 11). Alkaloidy tazettinového typu byly nalezeny v rodech *Narcissus*, *Galanthus*, *Crinum*, *Hippeastrum*, *Lapiedra*, a *Lycoris*²⁵.

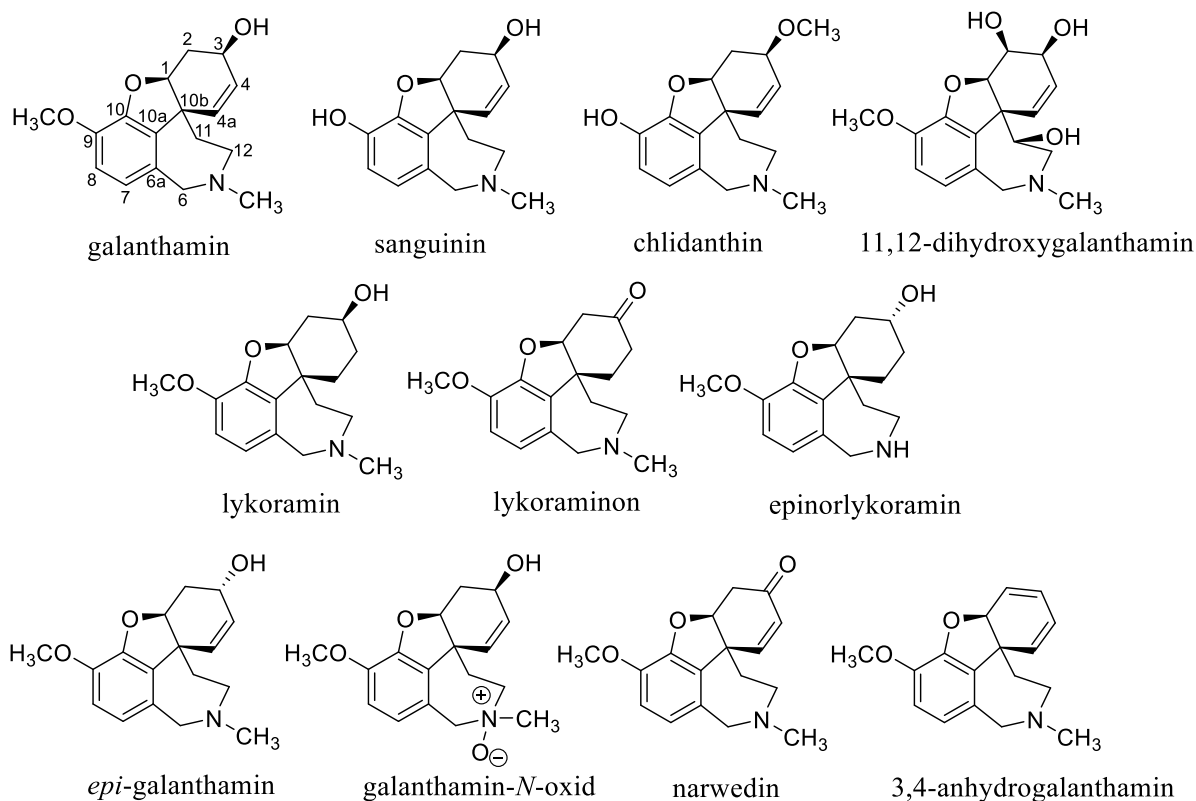


* absolutní konfigurace nebyla dosud objasněna

Obrázek 11: Vybrané alkaloidy tazettinového typu

Dosud bylo popsáno téměř 50 alkaloidů galanthaminového strukturního typu, jejichž kostra je tvořena benzofurobenzazepinem⁴⁷. Strukturní rozmanitost těchto látek vychází z kombinace různých substituentů na uhlících C3, C9, C11 a dusíku. Prozatím byla popsána jediná struktura se substituentem na uhlíku C2 (2β,11β-dihydroxygalanthamin). Na uhlíku C3 byly popsány keto-, hydroxy-, methoxy-, acetoxy-, 3-hydroxybutanoyl-, 3-acetoxybutanoyl- a 2-butanoyl-substituce, tyto substituenty zaujímají u většiny látek β-pozici. V případě některých substituentů je opět diskutováno, zda se jedná o přirozeně se vyskytující látky. S velkou pravděpodobností jsou tyto látky izolačními artefakty, kdy k izolačním procesům byla použita různá rozpouštědla. Pozice C9 bývá substituována methoxy- nebo hydroxy- skupinami, uhlík C11 hydroxy- skupinou, na dusíku byly popsány methyl-, acetyl-, formyl-, allyl- a methylallyl-

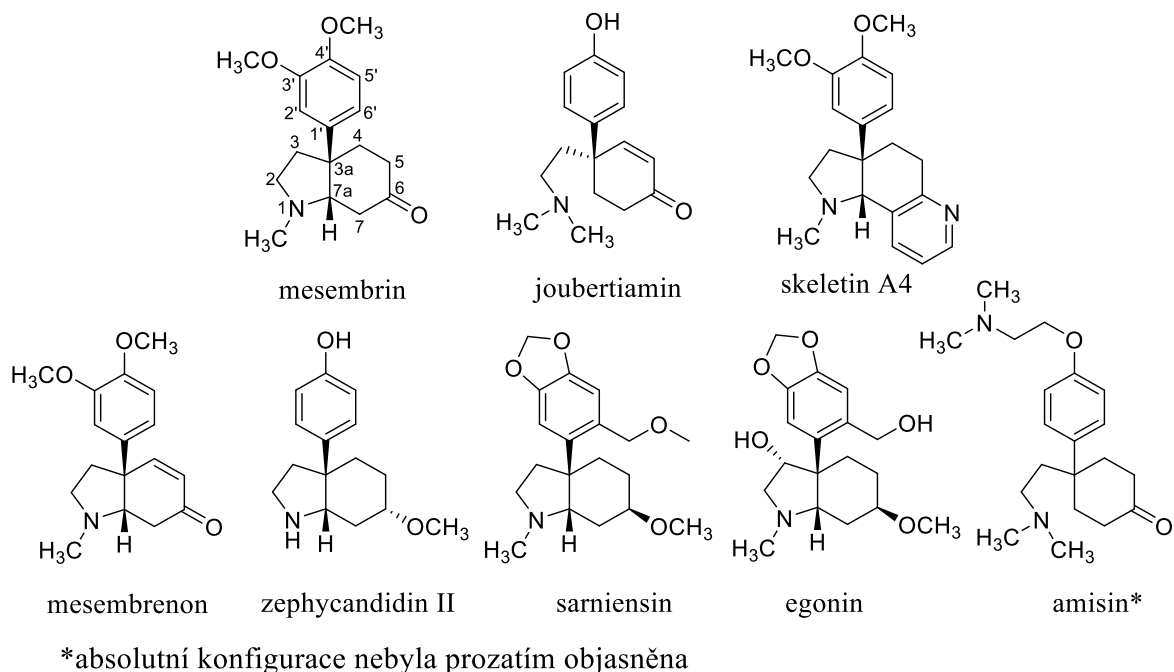
skupiny. Od těchto látek byly popsány i odpovídající *N*-oxidy²². Rozlišujeme dva podtypy těchto alkaloidů: i) galanthaminový typ s dvojnou vazbou mezi uhlíky C4 a C4a a ii) lykoraminový typ s nasycenou vazbou mezi uhlíky C4 a C4a. Během izolace může galanthamin vlivem kyselin, světla nebo vzduchu konvertovat na galanthamin *N*-oxid, *epi*-galanthamin, narwedín, 3,4-anhydrogalanthamin a další látky, opět se tedy může jednat o izolační artefakty⁴⁸ (Obr. 12).



Obrázek 12: Vybrané alkaloidy galanthaminového strukturního typu

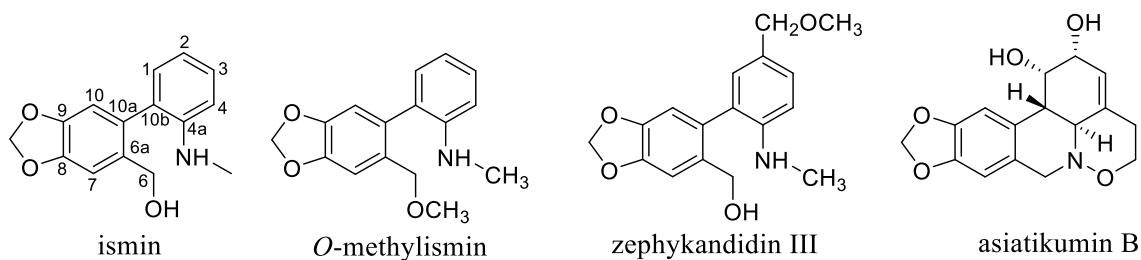
Mesembranové alkaloidy (alkaloidy typu *Sceletium*) jsou aktivními složkami rostlin rodu *Sceletium* (Aizoaceae). Rod *Sceletium* je jediným známým rodem, který obsahuje relativně vysoké množství těchto alkaloidů. Ostatní příbuzné rostliny nebo jiné rody obsahují výrazně menší množství těchto alkaloidů, pokud vůbec⁴⁹. Alkaloidy tohoto strukturního typu byly popsány i u některých zástupců Amaryllidoideae, konkrétně u rostlin *Hymenocallis arenicola*⁵⁰, *Crinum oliganthum*³⁵, *Nerine sarniensis*⁵¹ a u některých druhů narcisů ze sekce Ganymedes^{52, 53}. Narcisy patřící do této skupiny biosyntetizují buď jen alkaloidy mesembranového typu, nebo alkaloidy mesembranového typu v doprovodu alkaloidů tazettinového strukturního typu, což by mohlo naznačovat určitý biosyntetický vztah²². Mesembranové alkaloidy lze rozdělit do tří podskupin, které jsou reprezentovány mesembrinem, joubertiaminem a skeletinem A4, jejichž kostra je tvořena

3a-fenyl-*cis*-oktahydroindolem⁵³ (Obr. 13). V současnosti je těmto strukturám věnována pozornost z důvodu jejich potenciálního využití v terapii depresivních poruch, protože působí jako inhibitory zpětného vychytávání serotoninu⁵³⁻⁵⁵.



Obrázek 13: Vybrané alkaloidy mesembranového strukturního typu

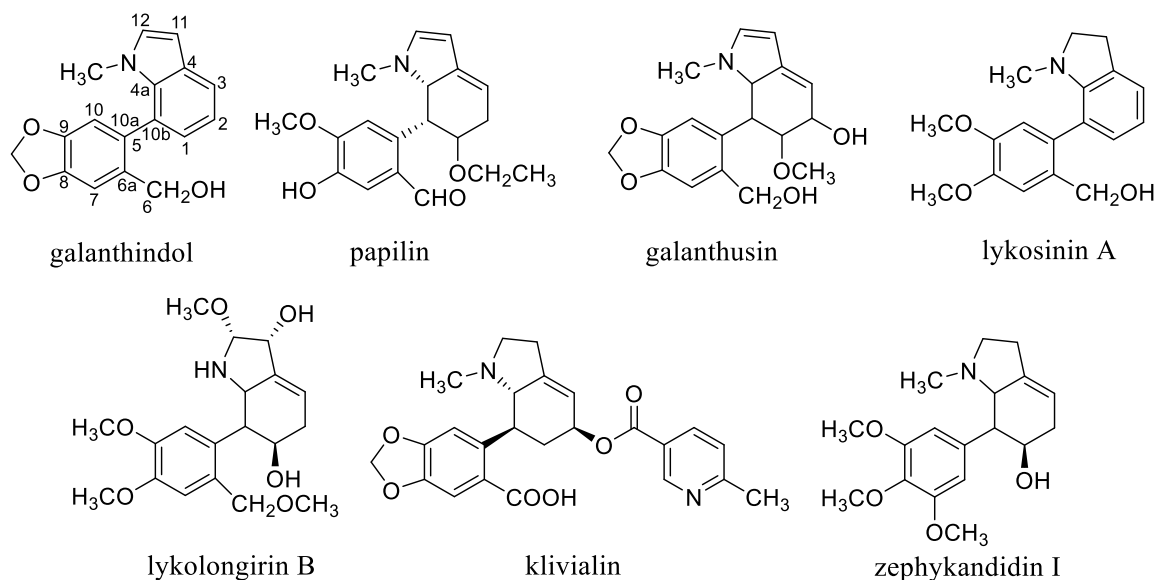
Základní struktura alkaloidů isminového strukturního typu je tvořena fenanthridinem, který je více či méně modifikován. Pokud je rozštěpena vazba mezi N5 a C6 v molekule fenanthridinu, získáme strukturu isminu nebo *O*-methylisminu. Za fenanthridinový alkaloid by se dal považovat i asiatikumín B, který v molekule obsahuje další atom kyslíku, což je v současnosti jediný známý příklad³³ (Obr. 14). Alkaloidy isminového strukturního typu byly izolovány z rodů *Galanthus*, *Hippeastrum*, *Pancreatium* a *Zephyranthes*²².



Obrázek 14: Vybrané alkaloidy fenanthridinového a isminového strukturního typu

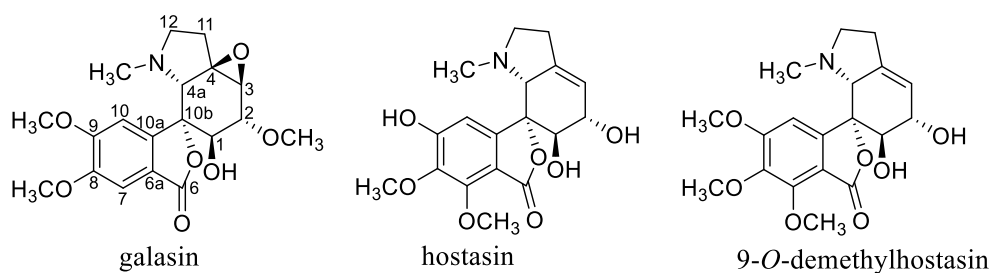
V rámci fytochemické studie *Galanthus plicatus* subsp. *byzantinus* byl izolován a strukturně popsán alkaloid galanthindol⁵⁶. Jedná se o první alkaloid izolovaný z čeledi Amaryllidaceae, který ve své struktuře obsahuje nekondenzovaný indolový kruh. Dobře známé alkaloidy homolykorinového (2-benzopyrano[3,4-*g*]indol) nebo tazettinového typu

(2-benzopyrano[3,4-c]indol) ve své kostře sice nesou indolový kruh, ale ten je vždy kondenzován na zbytek molekuly. Alkaloidy typu galanthindolu mají otevřený kruh B, kruh C se u jednotlivých alkaloidů liší stupněm nasycení vazeb⁵⁷. K tomuto strukturnímu typu řadíme lykosinin A, lykolongirin B nebo klivialin, které mají ve své molekule začleněn nekondenzovaný dihydroindolový kruh²² (Obr. 15).



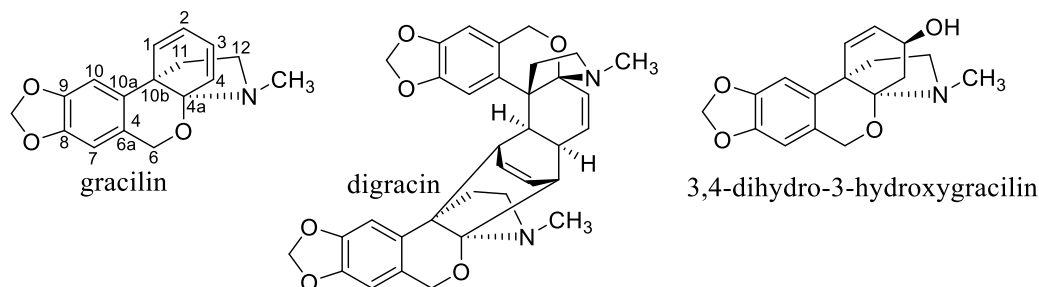
Obrázek 15: Vybrané alkaloidy galanthindolového strukturního typu

Alkaloidy galasinového strukturního typu jsou charakterizovány přítomností γ -laktonového kruhu B. Galasin byl prvním amarylkovitým alkaloidem, u kterého bylo popsáno spirocyklické uspořádání a epoxyskupina mezi uhlíky C3 a C4 (Obr. 16). Alkaloidy tohoto strukturního typu byly izolovány z *Galanthus elwesii* (Amaryllidaceae) a *Lycoris* (Amaryllidaceae)²². Obecně lze říct, že alkaloidy s pětičlenným laktonovým kruhem B jsou v přírodě velmi vzácné, existuje jen několik zástupců. Mezi tyto sloučeniny řadíme galasin a sloučeniny, které místo toho mají v molekule místo epoxy- skupiny dvojnou vazbu mezi C3 a C4, příkladem je hostasin a jeho deriváty. Hostasin byl poprvé izolován z *Hosta plantaginea* (Liliaceae), až později byl izolován i z některých rostlin čeledi Amaryllidaceae např. z *Lycoris albiflora*^{22, 33}.



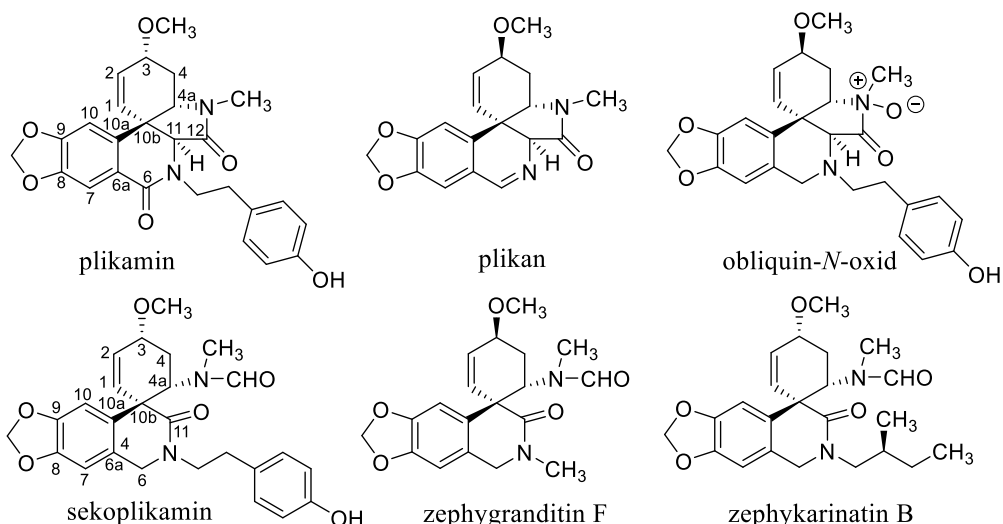
Obrázek 16: Vybrané alkaloidy galasinového strukturního typu

Alkaloidy gracilinového typu byly poprvé izolovány z rostlin rodu *Galanthus*⁵⁸, za využití GC/MS analýzy byly tyto látky identifikovány i v *Pancreatium maritimum*⁵⁹. Alkaloidy tohoto strukturního typu obsahují ve své struktuře 10b,4a-ethanoiminodibenzo[b,d]pyranový skelet. Tento strukturní typ byl pojmenován po prvním zástupci (+)-gracilinu izolovaném z *Galanthus gracilis*⁶⁰ (Obr. 17). Do tohoto typu dále patří dimerní alkaloid (–)-digracin, který byl spolu s 11-acetoxygracilinem a (+)-3,4-dihydro-3-hydroxygracilinem izolován ze sněženky *Galanthus plicatus* subsp. *byzantinus*^{58, 60}.



Obrázek 17: Vybrané alkaloidy gracilinového strukturního typu

Izolace (+)-plikaminu a (–)-sekoplikaminu z turecké sněženky *Galanthus plicatus* subsp. *byzantinus* neznamenal jen objev dalšího strukturního typu AAs, ale také první výskyt alkaloidů se dvěma atomy dusíku v molekule v rámci čeledi Amaryllidaceae⁶¹. V obou případech se jedná o modifikovanou strukturu tazettinu. U plikaminového strukturního typu je kyslík v poloze 7 molekuly tazettinu nahrazen atomem dusíku, který je substituovaný 4-hydroxyfenylethylovou skupinou. U sekoplikaminového typu je molekula tazettinu ještě více modifikována. Opět je nahrazen kyslík v poloze 7 za atom dusíku, na uhlíku C4a je navázána *N*-methyl-*N*-formylaminová skupina, kruh D tedy v molekule sekoplikaminu chybí⁶¹ (Obr. 18). Alkaloidy plikaminového a sekoplikaminového typu byly izolovány i z některých druhů rodu *Zephyranthes*^{62, 63}.

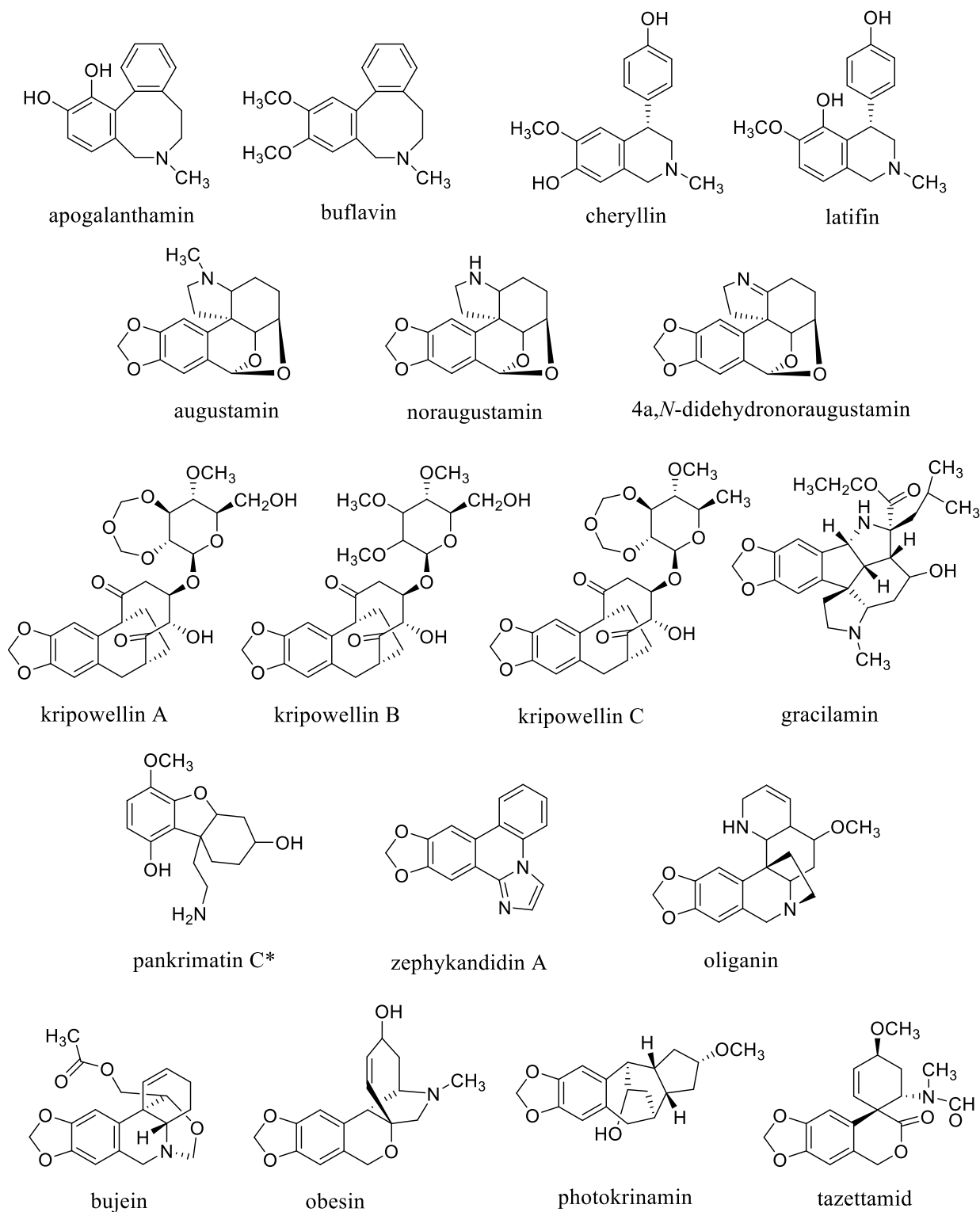


Obrázek 18: Vybrané alkaloidy plikaminového a sekoplikaminového typu

Buflavin a 8-O-demethylbuflavin byly izolovány z *Boophane flava*. V případě této rostliny se jedná o endemický druh rostoucí v jižní Africe⁶⁴. Základní struktura buflavinu je tvořena 5,6,7,8-tetrahydrobenzo[c,e]azocinem, což odpovídá struktuře apogalathaminu, degradačního produktu galanthaminu²². Struktura vzbudila zájem kvůli svému adrenolytickému a antiserotoninovému účinku, rovněž je popsána i totální syntéza tohoto alkaloidu⁶⁵.

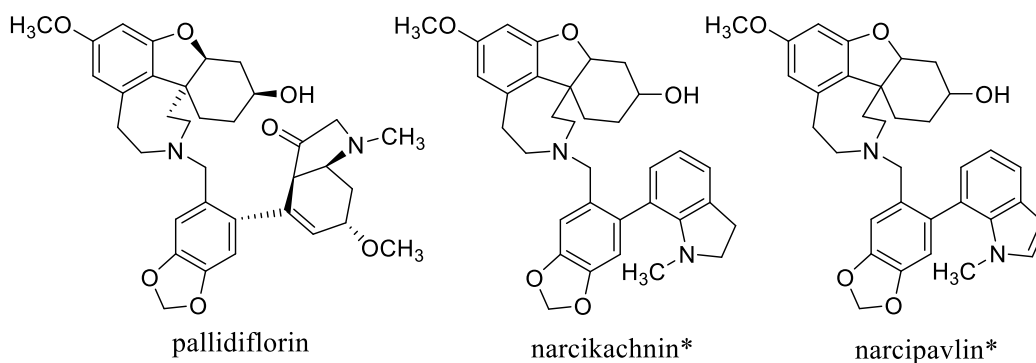
Cheryllin a latifin řadíme do cheryllinového strukturního typu AAs, cheryllin byl izolován z cibule *Crinum latifolium* a *Crinum bulbispermum*, jeho biogeneticky příbuzný izomer latifin byl nalezen pouze v *Crinum bulbispermum*³³. Alkaloidy, noraugustamin a 4a, N-didehydronoraugustamin, izolované z *Crinum kirkii* představují modifikované strukтуры augustaminu, který byl izolován pouze jednou z druhu *Crinum augustum*⁶⁶. Osm alkaloidů kripowellinového strukturního typu bylo nalezeno v několika druzích rodu *Crinum*⁶⁷.⁶⁸. Kostru těchto alkaloidů tvoří bicyklický laktamový kruh, který zřejmě vzniká oxidativním štěpením vazby C4a–C10b haemanthaminu²² (Obr. 19). (+)-Gracilamin, který byl poprvé izolován z *Galanthus gracilis* v roce 2005, je prvním případem amarylkovitěho alkaloidu s pěti kruhy a dvěma atomy dusíku⁵⁷. Mezi amarylkovitými alkaloidy se můžeme setkat jak s homodimery jako v případě již zmiňovaného (–)-digracinu, tak i s heterodimery. Pallidiflorin, izolovaný z *Narcissus pallidiflorus*, je tvořen spojením galanthaminového a tazettinového kruhu³³. Dalším příkladem jsou dimery narcipavlin a narcikachnin izolované z *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol, jejichž struktury představují kombinaci galanthaminového a galanthindolového strukturního typu⁶⁹ (Obr. 20). V souvislosti s neobvyklými alkaloidními strukturami izolovanými v rámci čeledi Amaryllidaceae stojí dále za zmínku pankrimatin C

(*Pancreatium maritimum*), zephykandidin A (*Zephyranthes candida*) a oliganin (*Crinum oliganthum*)²².



*absolutní konfigurace nebyla dosud objasněna

Obrázek 19: Amarylkovité alkaloidy různých strukturálních typů



*absolutní konfigurace látek nebyla objasněna

Obrázek 20: Vybrané dimerní alkaloidy

3.2 Botanická charakteristika rodu *Zephyranthes*

Název rodu *Zephyranthes* pochází ze staré řečtiny, kde slovo „*Zephyrus*“ označuje řeckého boha západního větru a „*anthos*“ v překladu znamená květina. Rostliny tohoto rodu jsou známé pod lidovými názvy fairy lily (čarovná lilie), rain flower (květ deště), zephyr lily (lilie vánku), magic lily (kouzelná lilie) a rain lily (dešťová lilie). Latinský název rodu i řada lidových názvů odkazují na fakt, že řada rostlin tohoto rodu nakvétá bezprostředně po deštích, které přináší právě západní vítr⁷⁰. Rod *Zephyranthes* má význačné postavení v lidovém léčitelství celé řady zemí. *Z. parulla* byl využíván k léčbě nádorových onemocnění (Peru) a *Z. rosea* k terapii rakoviny prsu (Čína)⁷¹. Afričtí domorodci léčili pomocí listů *Z. candida* diabetes mellitus, extrakty z cibulí *Z. rosea* a *Z. flava* našly využití v Indii při léčbě diabetu a virových infekcí⁷⁰. Rostliny rodu *Zephyranthes* se původně vyskytovaly ve vyšších nadmořských výškách na západní polokouli v zemích jako je Mexiko a Argentina. Mezi zástupci rodu můžeme nalézt endemické druhy, ale i rostliny které zdomácněly v Indii, Indonésii, Thajsku a na Havaji, kde se pěstují pro okrasné účely. V současnosti jsou zástupci rodu *Zephyranthes* rozšířeny od subtropických až po tropické oblasti světa^{70, 72}. Tento rod zahrnuje téměř 88 botanicky akceptovaných zástupců⁷³ (Tab. 1). Jedná se o cibulovité trvalky, které se liší ve vzhledu cibulí, květů a listů (velikost, barva). Cibule mají na povrchu obvykle hnědou nebo černou barvu a jsou opatřeny stahovacími (kontraktilními) kořeny, velikost cibulí se pohybuje od 2,5 do 5 cm v průměru. Listy jsou opadavé, pochvaté s čárkovitou čepelí, jejich velikost se v závislosti na druhu různí. Nálevkovité květy vyrůstají jednotlivě, jsou vzpřímené a otevřené směřují vzhůru, mají 6 stejně dlouhých tyčinek. Barva květů je obvykle bílá, růžová nebo žlutá, u hybridů se můžeme setkat i s červenými, oranžovými a mnohobarevnými květy^{70, 74} (Obr. 21). Některé rostliny v době květu sladce voní. Semena mají tvar klínu nebo písmena D. Rostliny mohou kvést několikrát za sezónu, květy vydrží 1-2 dny⁷⁰.

Tabulka 1: Přehled botanicky akceptovaných rostlinných druhů rodu *Zephyranthes*⁷³

Uznávaný název druhu	Fytochemické práce
<i>Zephyranthes albiella</i> Traub	-
<i>Zephyranthes albolilacinus</i> Cárdenas	-
<i>Zephyranthes americana</i> (Hoffmanns.) Ravenna	-
<i>Zephyranthes amoena</i> Ravenna	-
<i>Zephyranthes andina</i> (R.E.Fr.) Traub	-
<i>Zephyranthes atamasco</i> (L.) Herb.	-
<i>Zephyranthes bella</i> T.M.Howard & S.Ogden	-
<i>Zephyranthes bifolia</i> (Aubl.) M.Roem.	-
<i>Zephyranthes brevipes</i> Standl.	-
<i>Zephyranthes breviscapa</i> Ravenna	-
<i>Zephyranthes briquetii</i> J.F.Macbr.	-
<i>Zephyranthes candida</i> (Lindl.) Herb.	75-80
<i>Zephyranthes capivarina</i> Ravenna	-
<i>Zephyranthes cardinalis</i> C.H.Wright	-
<i>Zephyranthes carinata</i> Herb.	81-84
<i>Zephyranthes cearensis</i> (Herb.) Baker	-
<i>Zephyranthes chlorosolen</i> (Herb.) D.Dietr.	-
<i>Zephyranthes chrysantha</i> Greenm. & C.H.Thomps.	-
<i>Zephyranthes ciceroana</i> M.M.Mejía & R.García	-
<i>Zephyranthes citrina</i> Baker	85, 86
<i>Zephyranthes clintiae</i> Traub	-
<i>Zephyranthes concolor</i> (Lindl.) Benth. & Hook.f.	87
<i>Zephyranthes crociflora</i> T.M.Howard & S.Ogden	-
<i>Zephyranthes cubensis</i> Urb.	-
<i>Zephyranthes depauperata</i> Herb.	-
<i>Zephyranthes dichromantha</i> T.M.Howard	-
<i>Zephyranthes diluta</i> Ravenna	-
<i>Zephyranthes drummondii</i> D.Don	-
<i>Zephyranthes elegans</i> Ravenna	-
<i>Zephyranthes erubescens</i> S.Watson	-
<i>Zephyranthes filifolia</i> Herb. ex Kraenzl.	88
<i>Zephyranthes flavissima</i> Ravenna	-
<i>Zephyranthes fluvialis</i> Ravenna	-
<i>Zephyranthes fosteri</i> Traub	-
<i>Zephyranthes fragrans</i> Ravenna	-
<i>Zephyranthes gracilis</i> Herb.	-
<i>Zephyranthes gratissima</i> Ravenna	-
<i>Zephyranthes guatemalensis</i> L.B.Spencer	-
<i>Zephyranthes hondurensis</i> Ravenna	-
<i>Zephyranthes howardii</i> Traub	-
<i>Zephyranthes insularum</i> H.H.Hume ex Moldenke	-
<i>Zephyranthes jonesii</i> (Cory) Traub	-
<i>Zephyranthes katherinae</i> L.B.Spencer	-
<i>Zephyranthes lagesiana</i> Ravenna	-
<i>Zephyranthes latissimifolia</i> L.B.Spencer	-

Tabulka 1 (pokračování)

Uznávaný název druhu	Fytochemické práce
<i>Zephyranthes leucantha</i> T.M.Howard	-
<i>Zephyranthes lindleyana</i> Herb.	-
<i>Zephyranthes longistyla</i> Pax	-
<i>Zephyranthes longituba</i> Flory ex Flagg & G.Lom.Sm.	-
<i>Zephyranthes macrosiphon</i> Baker	-
<i>Zephyranthes mesochloa</i> Herb. ex Lindl.	-
<i>Zephyranthes microstigma</i> Ravenna	-
<i>Zephyranthes minima</i> Herb.	-
<i>Zephyranthes minuta</i> (Kunth) D.Dietr.	62, 89-93
<i>Zephyranthes miradorensis</i> (Kraenzl.) Espejo & López-Ferr.	-
<i>Zephyranthes moctezumae</i> T.M.Howard	-
<i>Zephyranthes modesta</i> Ravenna	-
<i>Zephyranthes morrisclintii</i> Traub & T.M.Howard	-
<i>Zephyranthes nelsonii</i> Greenm.	-
<i>Zephyranthes nervosa</i> Herb.	-
<i>Zephyranthes nymphaea</i> T.M.Howard & S.Ogden	-
<i>Zephyranthes orellanae</i> Carnevali, Duno & J.L.Tapia	-
<i>Zephyranthes paranaensis</i> Ravenna	-
<i>Zephyranthes plumieri</i> H.H.Hume ex Moldenke	-
<i>Zephyranthes primulina</i> T.M.Howard & S.Ogden	-
<i>Zephyranthes proctorii</i> Acev.-Rodr. & M.T.Strong	-
<i>Zephyranthes pseudocolchicum</i> Kraenzl.	-
<i>Zephyranthes puertoricensis</i> Traub	-
<i>Zephyranthes pulchella</i> J.G.Sm.	-
<i>Zephyranthes purpurella</i> Ravenna	-
<i>Zephyranthes refugiensis</i> F.B.Jones	-
<i>Zephyranthes reginae</i> T.M.Howard & S.Ogden	-
<i>Zephyranthes rosalensis</i> Ravenna	-
<i>Zephyranthes rosea</i> Lindl.	94, 95
<i>Zephyranthes sessilis</i> Herb.	-
<i>Zephyranthes simpsonii</i> Chapm.	-
<i>Zephyranthes smallii</i> (Alexander) Traub	-
<i>Zephyranthes stellaris</i> Ravenna	-
<i>Zephyranthes subflava</i> L.B.Spencer	-
<i>Zephyranthes susatana</i> Fern.Alonso & Groenend.	-
<i>Zephyranthes texana</i> Hook*	96
<i>Zephyranthes traubii</i> (W.Hayw.) Moldenke	-
<i>Zephyranthes treatiae</i> S.Watson	-
<i>Zephyranthes tucumanensis</i> Hunz.	-
<i>Zephyranthes uruguaiana</i> Ravenna	-
<i>Zephyranthes versicolor</i> (Herb.) G.Nicholson	-
<i>Zephyranthes wrightii</i> Baker	-
<i>Zephyranthes yaviensis</i> Ravenna	-

*Z uvedené publikace není zřejmé, zda se jedná o *Zephyranthes texana* Hook nebo o *Z. texana* (Herb.) Baker. V případě druhé možnosti by se dnes jednalo o druh, který byl překlasifikován do jiného rodu, a to o *Habranthus tubispathus* (L'Hér.) Traub.

3.2.1 Přehled fytochemicky studovaných druhů rodu *Zephyranthes*

Následující text se zabývá základními charakteristikami fytochemicky studovaných rostlin z rodu *Zephyranthes*. Přehled doposud izolovaných alkaloidů v rámci rodu *Zephyranthes* shrnuje následující tabulka (Tab. 2) a obrázky (Obr. 22-26).

3.2.1.1 *Zephyranthes candida* (Lindl.) Herb.

Synonyma: *Amaryllis candida* Lindl., *Amaryllis nivea* Schult. & Schult.f., *Argyropsis candida* (Lindl.) M.Roem., *Atamosco candida* (Lindl.) Sasaki, *Plectronema candida* (Lindl.) Raf., *Zephyranthes nivea* (Schult. & Schult.f.) D.Dietr.⁹⁷

V případě *Zephyranthes candida* se jedná o jihoamerický druh, který se původně vyskytoval v severní Argentině, Uruguayi, Paraguayi a jižní Brazílii. Pěstuje se jako okrasná rostlina v zahradách, odkud byl zavlečen do dalších oblastí (jihovýchod USA, jižní Čína, Japonsko, jihovýchodní Austrálie, Nový Zéland, jižní Afriky). V současnosti patří k nejrozšířenějším druhům tohoto rodu⁹⁸. *Z. candida* je vytrvalá bylina s vejcovitou cibulkou dosahující průměru okolo 2,5 cm. Listy jsou světle zelené, čárkovité, zkroucené, 20-35 cm dlouhé a 0,2-0,4 cm široké, dužnaté, lysé. Stvol je 10-25 cm dlouhý, na jeho vrcholu vyrůstá jediný vzpřímený květ; toulec je blanitý, asi 2,5 cm dlouhý červenohnědý; okvěti je nálevkovité, trubka je až 1,4 cm dlouhá, zelená, kratší než toulec, okvětní cípy jsou vejčité, bílé, někdy vně narůžovělé. Plodem je tobolka dosahující až 12 mm v průměru^{97, 99}. V Číně je tradičně používána celá rostlina k léčbě křečí, epilepsie a tetanu, v Africe k léčbě diabetu⁷⁷. Z fytochemického hlediska jde o nejvíce prostudovanou rostlinu rodu *Zephyranthes*, ze které bylo izolováno téměř 50 alkaloidů. V letech 2016 a 2017 popsali G. Zhan et al. 20 nových alkaloidů ze *Z. candida* (6 alkaloidů galanthaminového typu, 8 alkaloidů plikaminového strukturního typu, 2 alkaloidy sekoplikaminového typu). Dále byl izolován zephykandidin A, první alkaloid s kostrou imidazo[1,2-f]phenanthridinu (Tab. 2). Zephykandidin I a III představují první 7-fenyl-hexahydroindolový a 5,2'-dimethyl-bifenyl-2-ylaminový alkaloid. Zephykandidin II je prvním C3a-fenyl-hexahydroindolovým alkaloidem izolovaným z rodu *Zephyranthes*^{63, 77, 79} (Obr. 26).

3.2.1.2 *Zephyranthes carinata* Herb.

Synonyma: *Amaryllis carinata* (Herb.) Spreng., *Amaryllis concinna* R.Morris, *Amaryllis lindleyana* Schult. & Schult.f., *Atamosco carinata* (Herb.) P.Wilson, *Pogonema carinata* (Herb.) Raf., *Zephyranthes tsouii* H. H. Hu¹⁰⁰

V tomto případě se také jedná o jihoamerický druh, který byl původně domácí v Mexiku, Kolumbii a Střední Americe. Pěstuje se jako okrasná rostlina v celé řadě dalších zemí (Indie, Argentina, Brazílie, Peru, jihovýchodní USA, jižní Afrika, Čína atd.)¹⁰¹. Rostlina dorůstá výšky 14-30 cm, má kulovité cibule s průměrem 2-3 cm. Listy jsou čárkovité, na bázi načervenalé, poté jasně zelené, poléhavé, 15-30 cm dlouhé a 6-8 mm široké. Na vrcholu stvolu vyrůstá jediný vzpřímený květ. Okvětí je nálevkovité, trubka 1-2,5 cm dlouhá, okvětní plátky jsou obvejčité, 3-6 cm dlouhé, růžové¹⁰⁰. Celé rostliny (v čínštině Sai-Fan-Hong-Hua) využívá tradiční čínská medicína k léčbě otoků, krvácení žaludku a hadích uštknutí⁸¹. Dosud bylo z rostliny izolováno 35 alkaloidů, 11 z nich bylo izolováno v nedávné době skupinou G. Zhana, jednalo se o alkaloidy náležící k plikaminovému, sekoplikaminovému a lykorinovému strukturnímu typu (Tab. 2)⁸¹.

3.2.1.3 *Zephyranthes citrina* Baker

Synonyma: *Atamosco eggersiana* (Urb.) Britton, *Zephyranthes eggersiana* Urb.¹⁰²

Domovinou tohoto druhu je Mexiko, Kuba a přilehlé oblasti. Tento druh je také pěstován jako okrasná rostlina v celé řadě světových oblastí (jih USA, Bahamy, Seychely, Jamajka, Thajsko)¹⁰³. Rostlina dorůstá do výšky 10-15 cm, cibule jsou kulovité. Listy jsou čárkovité až 35 cm dlouhé, poléhavé, 4 mm široké, listová čepel je matně zelená. Na vrcholu stvolu vyrůstá jediný vzpřímený květ. Okvětí je nálevkovité, trubka je zelená, vně zvětšuje svůj průměr (0,7-1 cm) a tvoří asi 1/3 délky okvětí. Okvětní lístky jsou petrklíčově žluté až zlatě žluté¹⁰². Druh *Z. citrina* byl prozatím poměrně málo fytochemicky studován, dosud bylo ze *Z. citrina* izolováno pouze 9 alkaloidů (Tab. 2)^{85, 86, 95, 104}.

3.2.1.4 *Zephyranthes concolor* (Lindl.) Benth. & Hook.f.

Synonyma: *Habranthus concolor* Lindl., *Hippeastrum concolor* (Lindl.) Baker¹⁰⁵

Z. concolor je endemickým druhem Mexika¹⁰⁶. Rostlina dorůstá výšky 15-30 cm, cibule mají 3-4 cm v průměru, jsou pokryté tmavě hnědou tunikou. Listy jsou čárkovité, matně zelené, širší než stvol. Stvol dosahuje 24-30 cm a vyrůstá na něm jediný květ. Květ je nálevkovitý, okvětí má 3,6-7,7 cm v průměru, trubka je zelená, okvětní lístky jsou na bázi žlutě-zelené na vrcholu žluté až žlutě-bílé¹⁰⁷. Existuje jediná fytochemická práce z roku 2011, v rámci které bylo ze 3 kg cibulí izolováno pět alkaloidů galanthaminového strukturního typu a galwesin⁸⁷ (Tab. 2, Obr. 23).

3.2.1.5 *Zephyranthes minuta* (Kunth) D.Dietr.

Synonyma: *Zephyranthes grandiflora* Lindl., *Amaryllis minima* Ker Gawl., *Amaryllis minuta* Kunth, *Zephyranthes nervosa* D.Dietr., *Zephyranthes pallida* M.Roem¹⁰⁸

Tento druh je domácí v Mexiku a na Guatemale, pěstováním se však rozšířil do dalších oblastí (Bangladeš, Hawai, Karibik)¹⁰⁹. *Z. minuta* dorůstá výšky 22-30 cm, kulovité cibule jsou na povrchu hnědé a mají 2,5 cm v průměru. Listy jsou čárkovité, jejich čepel je leskle zelená, asi 7 mm široká. Stvol má 3-4 cm, vyrůstá na něm jediný nálevkovitý květ. Okvětí je růžové, velké až 9 cm, trubka je zelená¹⁰⁸. Z rostliny bylo izolováno téměř 20 alkaloidů, většina z nich přísluší k lykorinovému strukturnímu typu. V rámci dvou prací byly pomocí GC/MS a UPLC-DAD/ESI-MS/MS identifikovány některé alkaloidy, které se však zatím z rostliny nepodařilo izolovat^{91, 92}. Nedávno byl z rostliny izolován nový narciklasinový glykosid, narciklasin-4-*O*-β-D-xylopyranosid⁸⁹ (Tab. 2, Obr. 23).

3.2.1.6 *Zephyranthes rosea* Lindl.

Synonyma: *Amaryllis carnea* Schult. & Schult.f., *Amaryllis rosea* (Lindl.) Spreng., *Atamasco rosea* (Lindl.) Greene, *Zephyranthes carnea* (Schult. & Schult.f.) D.Dietr.¹¹⁰

Z. rosea je původní v Peru a Kolumbii, ale tento druh byl zavlečen i do řady dalších zemí (Florida, Kuba, Velké Antily, Indie atd.)¹¹¹. Rostlina dorůstá výšky 15-20 cm. Listy jsou čárkovité, čepele matně zelené, asi 5 mm široké. Na stvolu vyrůstá jediný přímý květ, okvětí je nálevkovité, asi 3 cm velké, trubka je zelená. Okvětní lístky jsou vejčité, jasně růžové¹¹⁰. Tento druh byl fytochemicky studován pouze dvakrát, naposledy roku 1985, kdy byl izolován (+)-epimaritidin⁷⁰ (Tab. 2, Obr. 25).

3.2.2 Fytochemicky studované druhy dříve řazené do rodu *Zephyranthes*

Vzhledem k nedávným botanickým studiím byly některé druhy původně zařazené do rodu *Zephyranthes* reklasifikovány a přeřazeny do jiných rodů. Konkrétně se jedná o druhy *Z. robusta* Baker, *Z. flava* a *Z. tubispatha*, které byly reklasifikovány na *Habranthus robustus* Herb. Ex Sweet, *H. tubispathus* (L'Hér.) Traub a *Pyrolirion flavum* Herb. V literatuře lze nalézt několik fytochemických prací zabývajících se *Z. sulfurea* a *Z. lancesteri*, není však jasné, o které druhy se podle současného systému jedná, proto nejsou v rámci této práce uvedeny⁷³. Přehled všech izolovaných alkaloidů z rostlin dříve řazených do rodu *Zephyranthes* shrnuje následující tabulka (Tab. 2) a obrázek (Obr. 22-26).

3.2.2.1 Habranthus robustus Herb. ex Sweet, dříve Z. robusta (Herb. Ex Sweet).

Synonyma: *Zephyranthes robusta* (Herb. ex Sweet) Baker, *Amaryllis berteroi* Spreng., *Atamasco taubertiana* (Harms) Greene, *Zephyranthes taubertii* Harms

H. robustus se přirozeně vyskytuje v Jižní Americe (Argentina, Brazílie a Uruguay). Rostlina dorůstá až 30 cm, cibule jsou kulovité, v průměru mají asi 3 cm. Z cibule vyrůstají úzké, lesklé, tmavě zelené, trávovité až čárkovité listy, dlouhé do 20 cm. Na stvolu (až 30 cm) vyrůstá jediný nálevkovitý růžový květ, na bázi bílý, velký asi 7-8 cm. Z rostliny bylo izolováno 15 alkaloidů, většina z izolovaných látek náleží ke krininovému a haemanthaminovému strukturnímu typu (Tab. 2)⁷⁰.

3.2.2.2 Habranthus tubispathus (L'Hér.) Traub, dříve Zephyranthes tubispatha (L'Hér.)

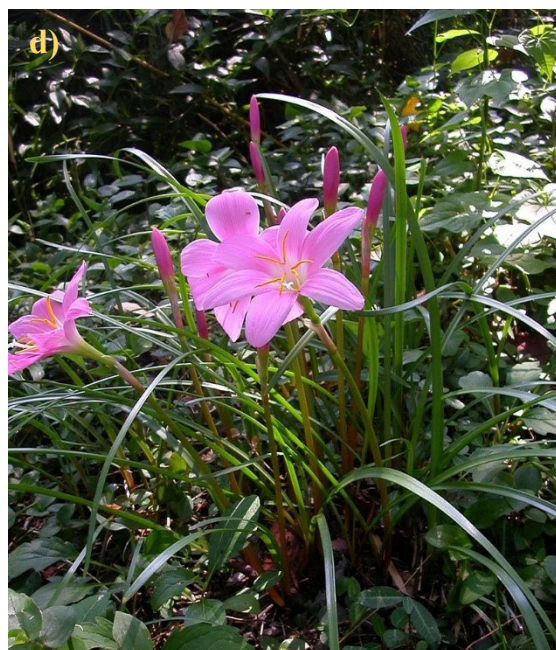
Synonyma: *Zephyranthes tubispatha* (L'Hér.) Herb., *Zephyranthes texana* (Herb.) Baker, *Zephyranthes andersonii* (Herb. ex Lindl.) Baker, *Hippeastrum tubispathum* (L'Hér.) Baker¹¹²

Rostlina je domácí v Jižní Americe (Argentina, Bolívie, Brazílie, Paraguay, Uruguay), ale rozšířila se i do dalších oblastí Jižní Ameriky, USA a Indie¹¹³. *H. tubispathus* dorůstá 20-30 cm, cibulka je vejcovitá. Čepel listu je čárkovitá, do 4 mm široká, zelená, přímý stvol je 20-30 cm vysoký, toulec 1,9-3,1 cm dlouhý. Květ je nálevkovitý, 2,1-3,1 cm v průměru, okvětní lístky jsou světle žluté nebo oranžovožluté, někdy vně červeně naběhlé, tyčinky mají nestejně dlouhé nitky. Plodem je tobolka¹¹⁴. Z tohoto druhu byly zatím izolovány pouze lykorin, powellin, tubispacin a nerispin. U posledního zmíněného alkaloidu se s pomocí dostupné literatury nepodařilo dohledat vzorec, proto není látka uvedena v tabulce. Dalších 8 alkaloidů bylo sice identifikováno pomocí GC/MS, ale nebyly z rostliny vyizolovány (Tab. 2)¹¹⁵.

3.2.2.3 Pyrolirion flavum Herb., dříve Zephyranthes flava (Herb.)

Synonyma: *Zephyranthes flava* (Herb.), *Amaryllis flava* (Herb.) Pav. ex Schult. & Schult.¹¹⁶

P. flavum je endemický druh vyskytující se v Peru. Rostlina byla z hlediska alkaloidního obsahu studována dvakrát, během těchto studií bylo získáno asi 20 alkaloidů, z nichž většina spadá do lykorinového strukturního typu (Tab. 2)^{117, 118}.



Obrázek 21: a) *Z. citrina*¹¹⁹, b) *Z. candida*¹²⁰, c) *Z. rosea*¹²⁰, d) *Z. carinata*¹²⁰, e) *H. tubispathus*¹²¹, f) *Z. grandiflora*¹²²

Tabulka 2: Alkaloidy popsané v rámci rodu *Zephyranthes*

Název	<i>Z. candida</i>	<i>Z. carinata</i>	<i>Z. citrina</i>	<i>Z. concolor</i>	<i>Z. minuta</i>	<i>Z. rosea</i>	<i>Z. texana</i>	<i>Z. robusta</i>	<i>Z. tubispatha</i>	<i>Z. flava</i>
Lykorinový strukturní typ										
9- <i>O</i> -Demethylgalanthine					89			123		
5,6-Dihydrolykorin	70, 124									
4,5-Ethano-2,8-dimethoxy-9-hydroxyphaenantridin	70, 83									
Fosfatidyllykorin										70, 118
Fosfatidyllykorinium methokation										70, 118
Fosfatidylpseudolykorin										70, 118
Galanthin		70, 125	70, 95		70, 93			70, 126		
Galanthin <i>N</i> - β -oxid		81								
2- <i>O</i> -Glycerofosforyllykorin										70, 118
Karinatin		70, 125								
Karinatin <i>N</i> - α -oxid		81								
Kriasbetain										70, 117
Lykorin	70, 127	70, 125	70, 95	70, 87	70, 93	70, 95	70, 96	70, 126	70	70, 117
Lykorin 1- <i>O</i> - β -D-glukosid										70, 117
Methylpseudolykorin										70, 117
Narcissidin			70, 85							
Pratorimin										70, 117
Pseudolykorin		81							115*	70, 117
Pseudolykorin 1- <i>O</i> - β -D-glukosid										70, 117
Tortuosin		70, 83			70, 93					
Ungeremin					70, 93					70, 117
Zaidein					91*					
Zefbetain										70, 117
Zeflabetain					91*					70, 117
Zephgrabetain					70, 93					
Zephykarinatin I		81								

Tabulka 2 (pokračování)

Název	<i>Z. candida</i>	<i>Z. carinata</i>	<i>Z. citrina</i>	<i>Z. concolor</i>	<i>Z. minuta</i>	<i>Z. rosea</i>	<i>Z. texana</i>	<i>Z. robusta</i>	<i>Z. tubispatha</i>	<i>Z. flava</i>
Zephyranthin	70, 128									
Homolykorinový strukturní typ										
Galwesiin				70, 87						
Hippeastrin										
2-Hydroxyalbomakulin	70, 124									
Lykorein			70, 95							
<i>O</i> -Methylnerin	70, 76									
Nerinin	70, 127									
Tazettinový strukturní typ										
3-Epimakronin	70, 76						70, 126			
Tazettin	70, 127	70			92*		70, 126	115*		
Pretazettin		70								70, 117
Narciklasinový strukturní typ										
5,6-Dihydrobikolorin	76									
<i>trans</i> -Dihydronarciklasin	70, 75									
<i>N</i> -Ethoxykarbonylethylkrinasiadin	70, 76									
<i>N</i> -Ethoxycarbonylpropylkrinasiadine	76									
<i>N</i> -Fenethylkrinasiadine	76									
1- <i>O</i> -(3- <i>O</i> -β-D-Glukopyranosylbutyryl)pankratistatin		70, 82								
1- <i>O</i> -(3-Hydroxybutyryl)pankratistatin		70, 82			89					
<i>N</i> -Isopentylkrinasiadin	70, 76									
Kalbreklasin										70, 117
<i>N</i> -Methylkrinasiadin	70, 76									
Narciklasin										70, 117
Narciklasin-4- <i>O</i> -β-D-xylopyranosid					89					
Pankratistatin	70, 124	70, 83			70, 90					
Trisphaeridin	70, 76	70, 83								

Tabulka 2 (pokračování)

Název	<i>Z. candida</i>	<i>Z. carinata</i>	<i>Z. citrina</i>	<i>Z. concolor</i>	<i>Z. minuta</i>	<i>Z. rosea</i>	<i>Z. texana</i>	<i>Z. robusta</i>	<i>Z. tubispatha</i>	<i>Z. flava</i>
Galanthaminový strukturní typ										
9- <i>O</i> -Demethyl-11 β -hydroxygalanthamin	63									
9- <i>O</i> -Demethyl-11 β -hydroxylykoramin	63									
<i>O</i> -Demethyllykoramin	63									
2 β ,11 β -Dihydroxygalanthamin	63									
3-Epilykoramin		81								
Epinorgalanthamin				70, 87						
Galanthamin	63	81		70, 87		70, 95		70, 126		
Galanthamin- <i>N</i> -oxid				70, 87						
11 β -Hydroxygalanthamin	63	81								
11 β -Hydroxygalanthamin <i>N</i> -oxid	63	81								
11 β -Hydroxylykoramin	63									
11 β -Hydroxylykoramin- <i>N</i> -oxid	63									
Chlidanthin				70, 87						
Lykoramin	63	81			70, 93			70, 126		
Lykoramin <i>N</i> -oxid		81			91*					
Sanguinin	63									
Krininový strukturní typ										
Ambellin					91*					
3- <i>O</i> -Demethylhippeastidin									115*	
10-Deoxy-6 α -hydroxyhippeastidin	70, 80									
Hippeastidin								70, 126	115*	
6 α -Hydroxyhippeastidin	70, 80									
6 β -Hydroxyhippeastidin	70, 80									
Krinamidin					91*					
Nerbowdin					92*					
Powellin									70	

Tabulka 2 (pokračování)

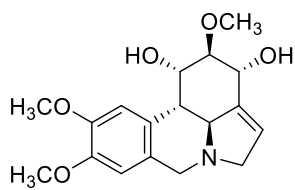
Název	<i>Z. candida</i>	<i>Z. carinata</i>	<i>Z. citrina</i>	<i>Z. concolor</i>	<i>Z. minuta</i>	<i>Z. rosea</i>	<i>Z. texana</i>	<i>Z. robusta</i>	<i>Z. tubispatha</i>	<i>Z. flava</i>
Tubispacin									70	
Zephyramin			37							
Haemanthaminový strukturní typ										
8- <i>O</i> -Demethylmaritidin								70, 126		
Dihydrovittatin					91*					
Epimaritidin						70, 94				
Hamayn		70, 83			70, 93			70, 126		
Haemanthamin	70, 127	70, 125	70, 85		70, 93	70, 94		70, 126	115*	70, 117
Haemanthidin	70, 124		70, 85					70, 126	115*	
11-Hydroxyvittatin								70, 126		
Krinamin						70, 94				70, 117
Maritidin			70, 85			70, 94		129	115*	70, 117
<i>N</i> -Methylhaemanthidin chlorid	70, 76									
Oxomaritidin			70, 85							
Vittatin			70, 85		89			70, 126		
Plikaminový strukturní typ										
Bliquin <i>N</i> -oxid	63	81								
<i>N</i> -Fenethyl-5,6-dihydroplikan		81								
<i>N</i> -Hexyl-5,6-dihydroplikan										
<i>N</i> -Hydroxykarbonylpropyl-5,6-dihydroplikan										
<i>N</i> -3-Indolyethyl-5,6-dihydroplikan										
<i>N</i> -Isopentyl-5,6-dihydroplikan	63	81								
<i>N</i> -Isopentyl-5,6-dihydroplikan <i>N</i> -oxid										
<i>N</i> -Methyl-5,6-dihydroplikan	63, 76	81								
Obliquin	63	81								
Obliquin <i>N</i> -oxid										
<i>N</i> -s-Pentyl-5,6-dihydroplikan										

Tabulka 2 (pokračování)

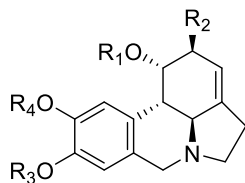
Název	<i>Z. candida</i>	<i>Z. carinata</i>	<i>Z. citrina</i>	<i>Z. concolor</i>	<i>Z. minuta</i>	<i>Z. rosea</i>	<i>Z. texana</i>	<i>Z. robusta</i>	<i>Z. tubispatha</i>	<i>Z. flava</i>
(+)-Plikan	63									
Zephygranditin A					62					
Zephygranditin B					62					
Zephygranditin C					62					
Zephykarinatin A		81								
Zephykarinatin C		81								
Zephykarinatin D		81								
Zephykarinatin E		81								
Zephykarinatin F		81								
Zephykarinatin G		81								
Sekoplikaminový strukturní typ										
<i>N</i> -Isopentyl-11,12-seko-5,6-dihydroplikan	63									
<i>N</i> -Methyl-11,12-seko-5,6-dihydroplikan	63									
Zephygranditin D					62					
Zephygranditin E					62					
Zephygranditin F					62					
Zephykarinatin B		81								
Montaninových strukturní typ										
Montanin									115*	
Alkaloidy dalších strukturních typů										
Nigragillin	70, 76									
Zephykandidin A	79									
Zephykandidin I	77									
Zephykandidin II	77									
Zephykandidin III	77									

*Tyto alkaloidy byly pouze identifikovány na základě GC/MS nebo HPLC/MS, ale nebyly izolovány z rostlinného materiálu.

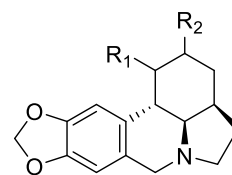
Alkaloidy lykorinového strukturního typu



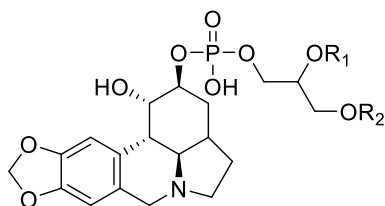
narcissidin



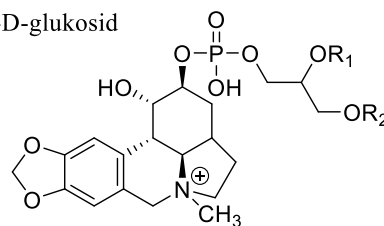
- $R_1=H, R_2=OCH_3, R_3=H, R_4=CH_3$ 9-*O*-demethylgalanthin
 $R_1=H, R_2=OCH_3, R_3=R_4=CH_3$ galanthin
 $R_1=H, R_2=OCH_3, R_3=CH_3, R_4=H$ karinatin
 $R_1=H, R_2=OH, R_3=R_4=CH_3$ methylpseudolykorin
 $R_1=H, R_2=OH, R_3=CH_3, R_4=H$ pseudolykorin
 $R_1=Glc, R_2=OH, R_3=CH_3, R_4=H$ pseudolykorin-1-*O*- β -D-glukosid



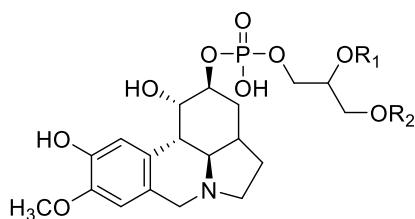
$R_1=\alpha OH, R_2=\beta OH$ 5,6-dihydrolykorin
 $R_1=R_2=\alpha OH$ zephyranthin



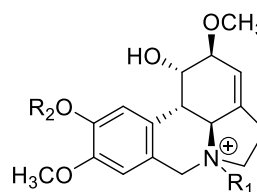
$R_1=stearoyl/oleoyl, R_2=palmitoyl$ fosfatidyllykorin
 $R_1=R_2=H$ 2-*O*-glycerofosforyllykorin



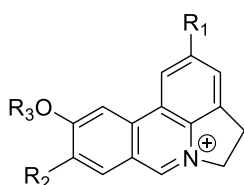
$R_1=stearoyl/oleoyl, R_2=palmitoyl$ fosfatidylmethyllykorinium



$R_1=stearoyl/oleoyl, R_2=palmitoyl$ fosfatidylpseudolykorin

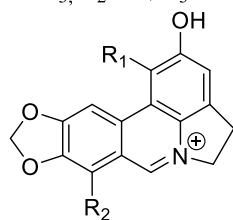


$R_1=\beta O^-, R_2=CH_3$ galanthin-*N*- β -oxid
 $R_1=\alpha O^-, R_2=H$ karinatin-*N*- α -oxid

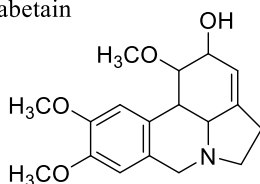


$R_1=H, R_2=OH$ lykorin
 $R_1=Glc, R_2=OH$ lykorin-1-*O*- β -glukosid

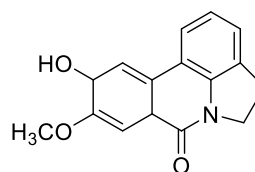
- $R_1=R_2=OCH_3, R_3=H$ 4,5-ethano-2,8-dimethoxy-9-hydroxyfenanthridin
 $R_1=O^-, R_2=OCH_3, R_3=CH_3$ kriasbetain
 $R_1=OCH_3, R_2=OCH_3, R_3=CH_3$ tortuosin
 $R_1=O^-, R_2=OCH_3, R_3=H$ zefbetain
 $R_1=OCH_3, R_2=O^-, R_3=CH_3$ zephgrabetain



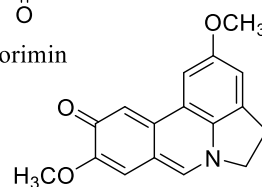
$R_1=R_2=H$ ungeremin
 $R_1=H, R_2=OCH_3$ zeflabetain



zaidin
(absolutní konfigurace
nebyla objasněna)



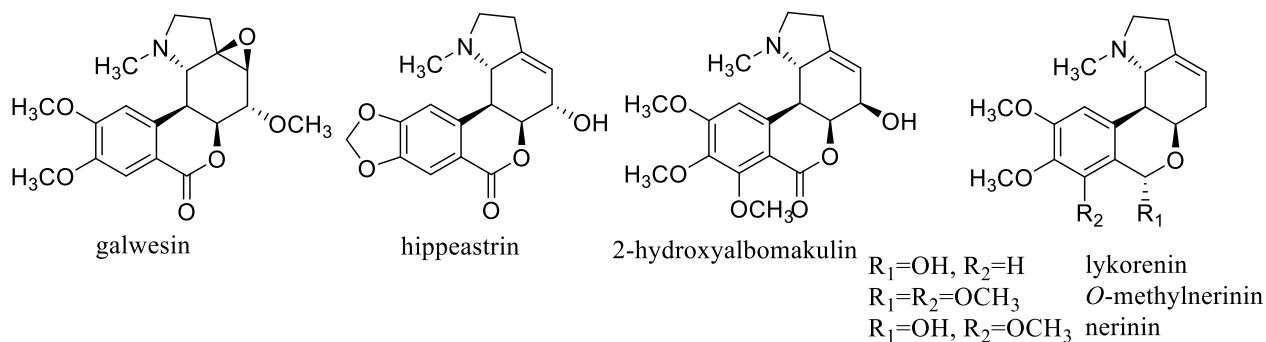
pratorimin



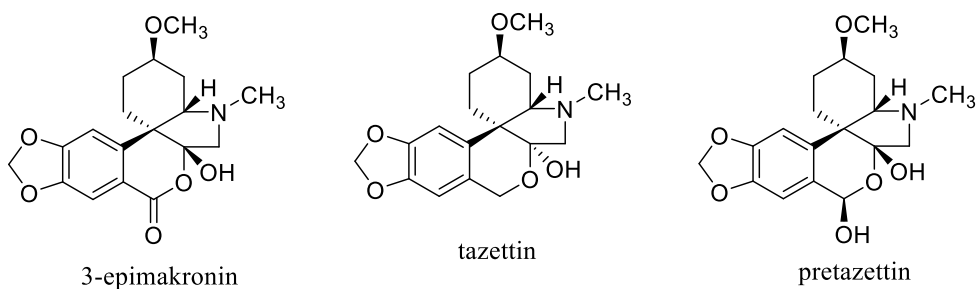
zephykarinatin

Obrázek 22: Alkaloidy lykorinového strukturního typu izolované v rámci rodu *Zephyranthes*

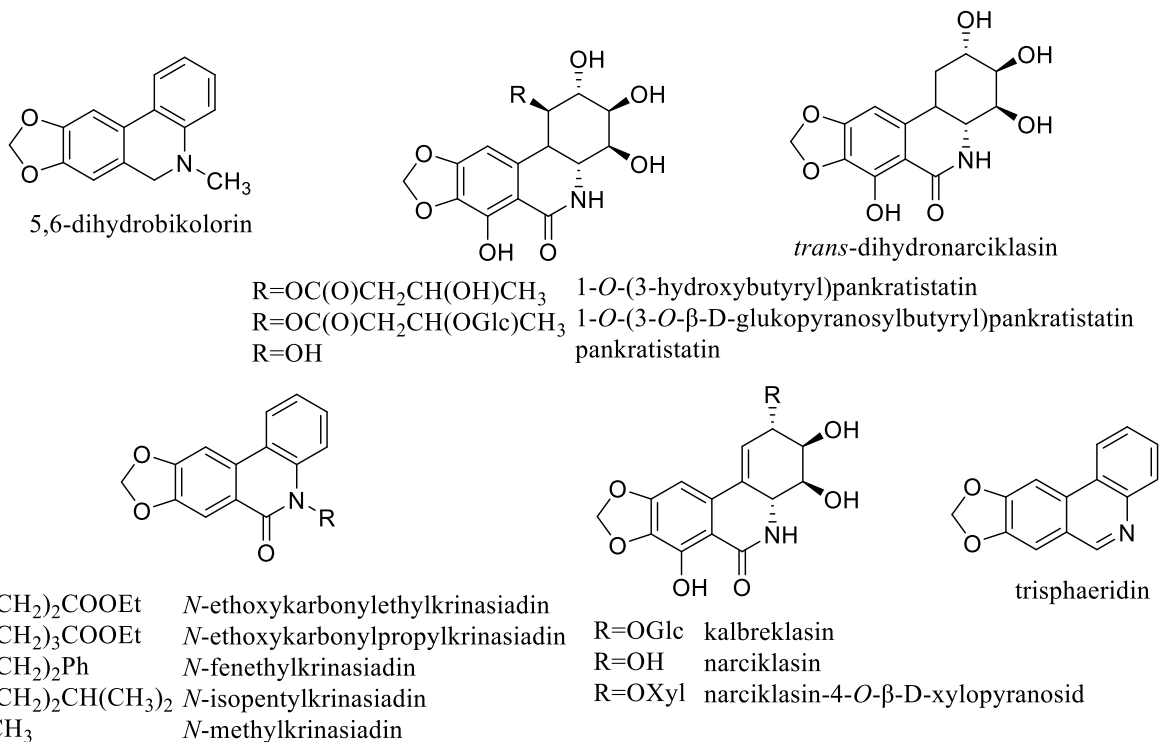
Alkaloidy homolykorinového strukturního typu



Alkaloidy tazettinového strukturního typu

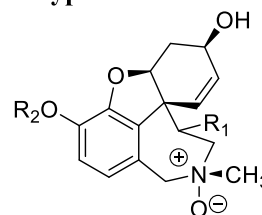
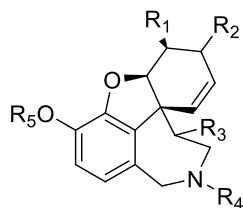


Alkaloidy narciklasinového strukturního typu



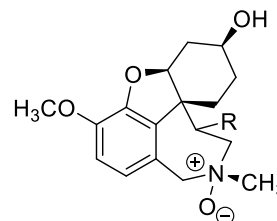
Obrázek 23: Alkaloidy homolykorinového, tazettinového a narciklasinového strukturního typu izolované v rámci rodu *Zephyranthes*

Alkaloidy galanthaminového strukturního typu

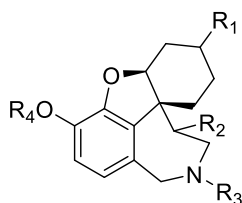


$R_1 = \beta\text{OH}, R_2 = \text{CH}_3$ 11β-hydroxygalanthamin-*N*-oxid
 $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{CH}_3$ galanthamin-*N*-oxid

$R_1 = \text{H}, R_2 = \beta\text{OH}, R_3 = \beta\text{OH}, R_4 = \text{CH}_3, R_5 = \text{H}$ 9-*O*-demethyl-11β-hydroxygalanthamin
 $R_1 = \text{OH}, R_2 = R_3 = \beta\text{OH}, R_4 = R_5 = \text{CH}_3$ 2β,11β-hydroxygalanthamin
 $R_1 = \text{H}, R_2 = \alpha\text{OH}, R_3 = R_4 = \text{H}, R_5 = \text{CH}_3$ *epi*-norgalanthamin
 $R_1 = \text{H}, R_2 = \beta\text{OH}, R_3 = \text{H}, R_4 = R_5 = \text{CH}_3$ galanthamin
 $R_1 = \text{H}, R_2 = R_3 = \beta\text{OH}, R_4 = R_5 = \text{CH}_3$ 11β-hydroxygalanthamin
 $R_1 = \text{H}, R_2 = \beta\text{OCH}_3, R_3 = \text{H}, R_4 = \text{CH}_3, R_5 = \text{H}$ chlidanthine
 $R_1 = \text{H}, R_2 = \beta\text{OH}, R_3 = \text{H}, R_4 = \text{CH}_3, R_5 = \text{H}$ sanguinin

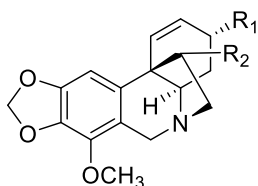


$R = \beta\text{OH}$ 11β-hydroxylykoramin-*N*-oxid
 $R = \text{H}$ lykoramin *N*-oxid

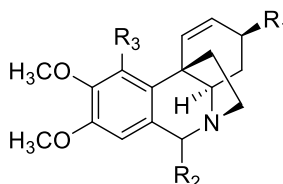


$R_1 = \beta\text{OH}, R_2 = \beta\text{OH}, R_3 = \text{CH}_3, R_4 = \text{H}$ 9-*O*-demethyl-11β-hydroxylykoramin
 $R_1 = \beta\text{OH}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{CH}_3, R_4 = \text{H}$ *O*-demethyllykoramin
 $R_1 = \alpha\text{OH}, R_3 = R_4 = \text{CH}_3$ 3-epilykoramin
 $R_1 = \beta\text{OH}, R_2 = \beta\text{OH}, R_3 = R_4 = \text{CH}_3$ 11β-hydroxylykoramin
 $R_1 = \beta\text{OH}, R_2 = \text{H}, R_3 = R_4 = \text{CH}_3$ lykoramin

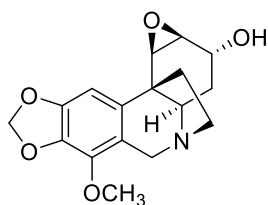
Alkaloidy krininového strukturního typu



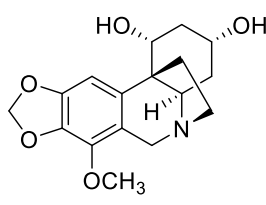
$R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OH}$ ambellin
 $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}$ powellin



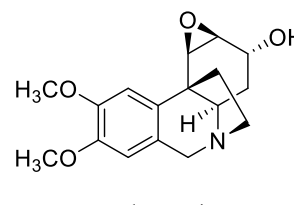
$R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{OH}$ 3-*O*-demethylhippeastidin
 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \alpha\text{OH}, R_3 = \text{H}$ 10-deoxy-6α-hydroxyhippeastidin
 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{OH}$ hippeastidin
 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \alpha\text{OH}, R_3 = \text{OH}$ 6α-hydroxyhippeastidin
 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \beta\text{OH}, R_3 = \text{OH}$ 6β-hydroxyhippeastidin



krinamidin



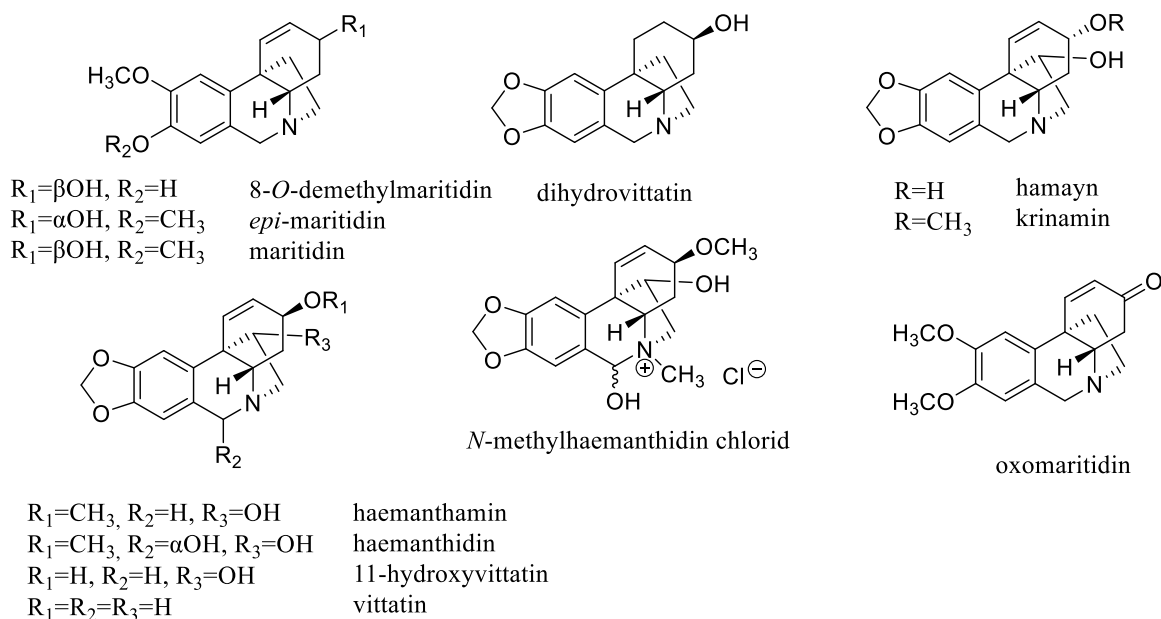
nerbowdin



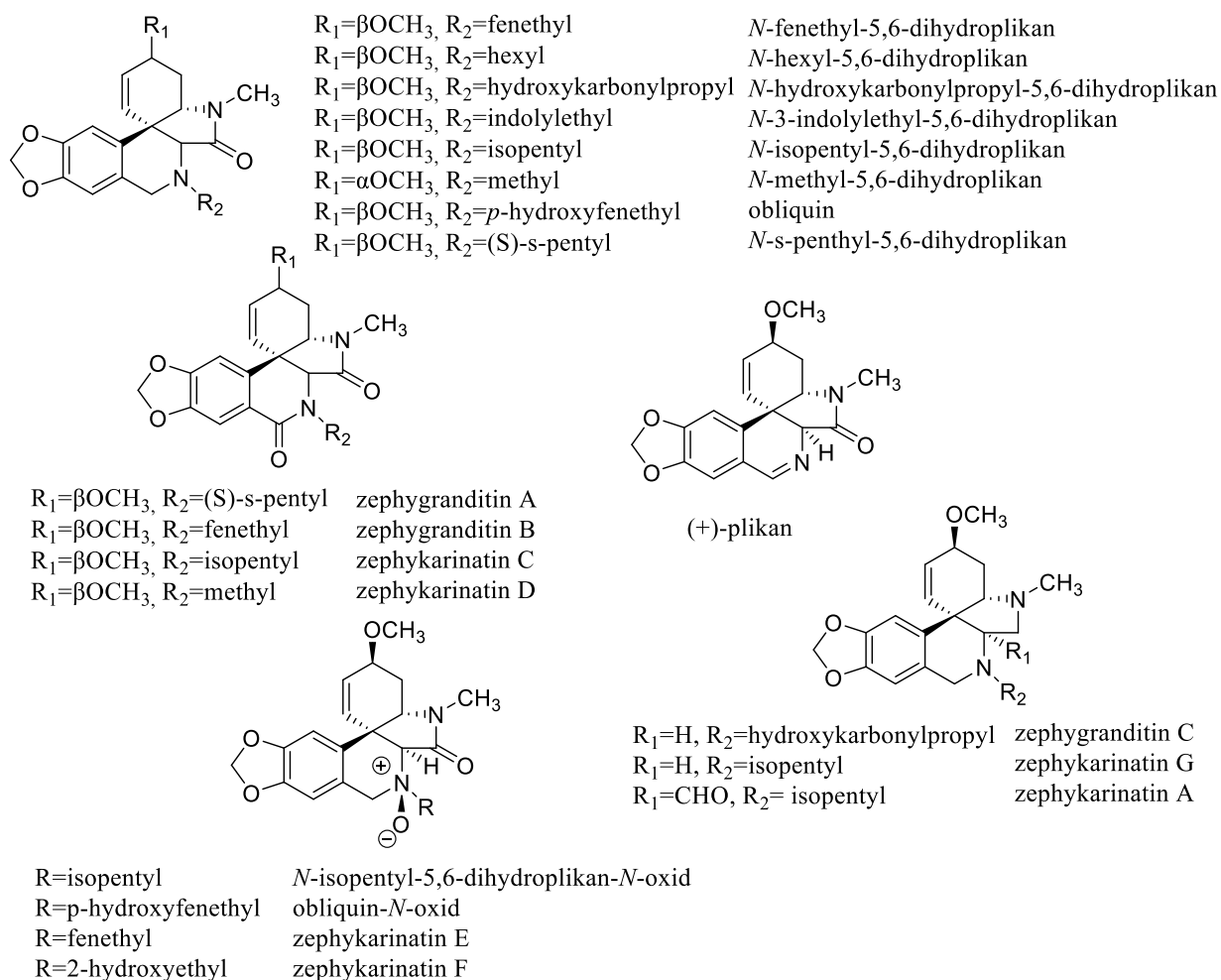
zephyramin

Obrázek 24: Alkaloidy galanthaminového a krininového strukturního typu izolované v rámci rodu *Zephyranthes*

Alkaloidy haemanthaminového strukturného typu

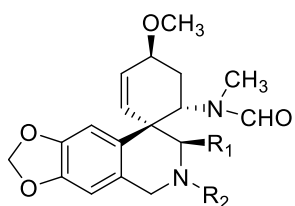


Alkaloidy plikaminového strukturného typu



Obrázek 25: Alkaloidy haemanthaminového a plikaminového strukturného typu izolované v rámci rodu *Zephyranthes*

Alkaloidy sekoplikaminového strukturního typu



R₁=O, R₂=isopentyl

R₁=O, R₂=methyl

R₁=H, R₂=*p*-hydroxyfenethyl

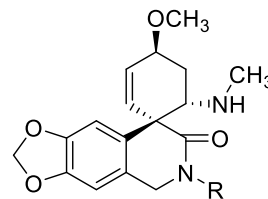
R₁=H, R₂=methyl

N-isopentyl-11,12-*seco*-5,6-dihydroplikamin

N-methyl-11,12-*seco*-5,6-dihydroplikamin

zephygranditin E

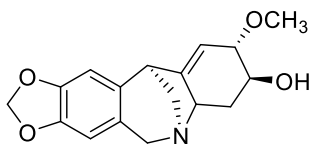
zephygranditin F



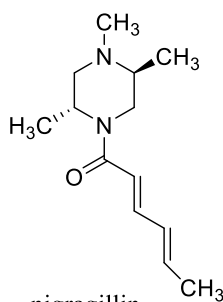
R=fenethyl zephygranditin D

R=isopentyl zephykarinatin

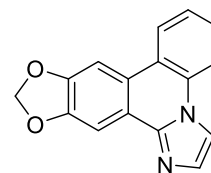
Montanin a alkaloidy dalších strukturních typů



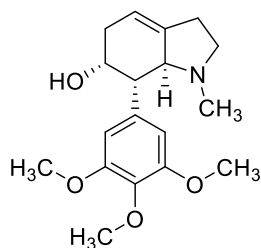
montanin



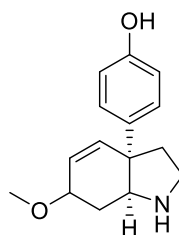
nigragillin



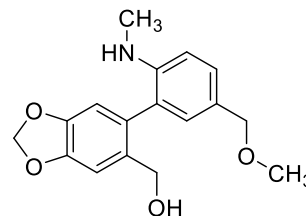
zephykandidin A



zephykandidin I



zephykandidin II



zephykandidin III

Obrázek 26: Alkaloidy sekoplikaminového strukturního typu a další alkaloidy izolované v rámci rodu *Zephyranthes*

3.3 Biologická aktivita Amaryllidaceae alkaloidů

3.3.1 Amaryllidaceae alkaloidy v terapii Alzheimerovy choroby

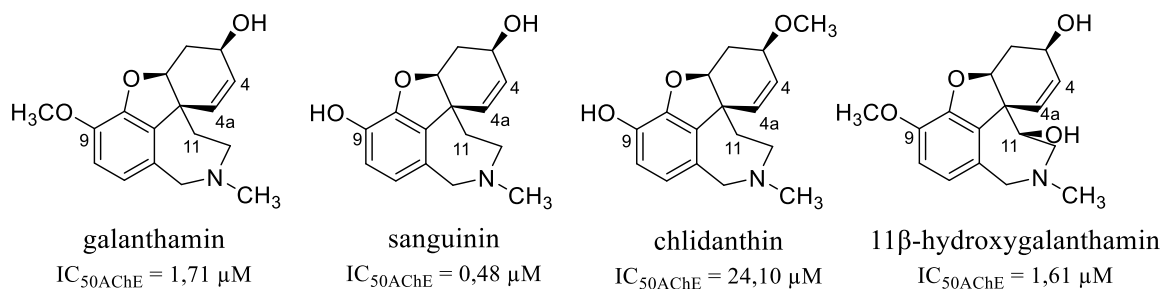
Alzheimerova choroba (AD) je neurodegenerativní onemocnění, které se klinicky prezentuje syndromem demence¹³⁰. Onemocnění bývá nejčastější příčinou demence u starší populace a celosvětově patří mezi 10 nejčastějších příčin úmrtí¹⁰. Etiologie AD nebyla dosud plně objasněna, jsou známy pouze jednotlivé patogenetické části a některé jejich souvislosti¹³¹. Mezi patogenetické faktory, které se podílejí na procesu neurodegenerace, patří ztráta centrálních cholinergních funkcí, tvorba amyloidních plaků a vznik neurofibrilárních klubek¹³⁰. Dosavadní farmakoterapeutické přístupy jsou pouze symptomatické, na trhu jsou dostupná tři léčiva ze skupiny inhibitorů acetylcholinesteráz (donepezil, rivastigmin a galanthamin) a antagonistů NMDA receptorů (memantin)¹³¹.

Cholinergní hypotéza je nejstarší teorie, pomocí které je vysvětlován vznik AD. Při AD je porušen metabolismus acetylcholinu (ACh) hned na několika úrovních: dochází ke snížení hladiny cholinacetyltransferázy (ChAT)^a, je sníženo zpětné vychytávání cholinu a tvorba ACh¹³². ACh je v organismu primárně odbouráván enzymem acetylcholinesterázou (AChE; E.C. 3.1.1.7), funkce butyrylcholinesterázy (BuChE; E.C. 3.1.1.8) je za fyziologických podmínek spíše podpůrná a nabývá na významu v pozdějších stádiích AD, kdy klesá množství a aktivita AChE a její roli pak přebírá právě BuChE¹³³. V tomto ohledu by bylo žádoucí najít látku, která by byla duálním inhibitorem obou těchto enzymů¹³⁴.

Se zavedením galanthaminu do klinické praxe vzrostl zájem o amaryllkovité alkaloidy, jakožto o potenciální zdroj nových inhibitorů acetylcholinesterázy. Galanthamin, se svojí hodnotou $IC_{50}=1,5 \mu M$, je několikanásobně silnějším inhibitorem AChE než většina AAs s popsanou anticholinesterázovou aktivitou. Existují však i výjimky⁸. Sanguinin je 9-hydroxyderivát galanthaminu, který vykazuje 10krát vyšší inhibiční účinek než galanthamin. Na druhou stranu epinorgalanthamin, který se liší od galanthaminu chybějící methylovou skupinou na atomu dusíku, vykazuje 10krát nižší inhibiční účinek než galanthamin. Také polohový izomer galanthaminu chlidanthin má výrazně nižší inhibiční aktivitu⁸⁷. Izolace dalších alkaloidů galanthaminového typu ze *Z. candida* přispěla k objasnění vztahu struktura-aktivita u tohoto strukturního typu AAs. Přítomnost dvojné vazby mezi uhlíky C4 a C4a v kruhu A a hydroxy- skupina v poloze 3 jsou pro inhibiční účinek vůči AChE zcela zásadní. Inhibiční

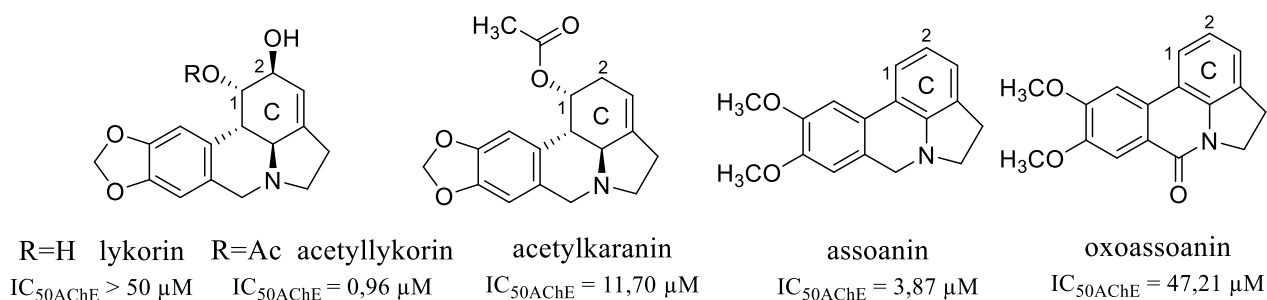
^a ChAT (enzym zodpovědný za syntézu ACh)

účinek zvyšuje hydroxy- skupina v poloze 9, hydroxy- skupina v poloze 11 vede naopak k poklesu aktivity¹³⁵ (Obr. 27, Tab. 3).



Obrázek 27: Alkaloidy galanthaminového typu s významnou inhibiční aktivitou vůči AChE

G. Zhan et al. sledovali inhibiční účinek u 11 alkaloidů plikaminového a 2 alkaloidů sekoplikaminového typu vůči AChE. Výsledky naznačují, že tyto strukturní typy alkaloidů nejsou optimálními inhibitory AChE⁶³. U zephykandidinu A a zephykandidinu I-III byly také zjišťovány inhibiční účinky vůči AChE, ale pouze zephykandidin III vykázal zajímavou inhibiční aktivitu vůči studovanému enzymu^{77, 79} (Obr. 26). Pokud hovoříme o AAs s významnou inhibiční aktivitou vůči AChE nelze opomenout některé alkaloidy lykorinového strukturního typu, které však byly izolovány mimo rod *Zephyranthes*. I pro tento strukturní typ alkaloidů byly definovány některé parametry vztahu struktura-aktivita. Přítomnost acetyl skupiny a hydroxylové skupiny v polohách 1 a 2 přispívá ke správné vazbě na AChE a následnému inhibičnímu účinku, jak můžeme sledovat u 1-*O*-acetyllykorinu a 1-*O*-acetylkaraninu. Aromatizací kruhu C, jež umožňuje molekulám assoaninu a oxoassoaninu planární uspořádání, lze vysvětlit vyšší aktivitu těchto látek v porovnání s ostatními alkaloidy typu lykorinu¹³⁶ (Obr. 28, Tab. 3). Je nutné zmínit, že ve většině diskutovaných studií byla použita komerčně dostupná AChE z elektrického úhoře. Otázkou je, zda by bylo dosaženo stejných nebo alespoň srovnatelných výsledků, v případě použití modelů bližších lidské AChE (erytrocytární, rekombinantní). Tento vliv původu enzymu je podrobněji popsán v rámci diskuse (str. 122).



Obrázek 28: Alkaloidy lykorinového typu s významnou inhibiční aktivitou vůči AChE

Tabulka 3: Inhibiční aktivita vybraných Amaryllidaceae alkaloidů vůči AChE

Alkaloidy izolované v rodu <i>Zephyranthes</i>			Ostatní Amaryllidaceae alkaloidy		
Sloučenina	IC ₅₀ (μM)	Ref.	Sloučenina	IC ₅₀ (μM)	Ref.
Ungeremin	0,35	137	1- <i>O</i> -Acetyllykorin	0,96	136
Sanguinin	0,48	63	11β-Hydroxygalanthamin	1,61	138
<i>N</i> -Methylkrinasiadin	4,23	139	<i>N</i> -Norgalanthamin	2,76	139
9- <i>O</i> -Demethyllykoramin	4,79	63	9- <i>O</i> -Methylpseudolykorin	2,84	140
Galanthin	6,10	81	11α-Hydroxy- <i>O</i> -methylleukotamin	3,5	141
Zephykandidin III	8,82	77	Assoanin	3,87	138
<i>epi</i> -Norgalanthamin	9,60	122	Leukotamin	5,3	141
Chlidanthin	24,1	87	<i>O</i> -Methylleukotamin	6,0	141
Galanthamin <i>N</i> -oxid	26,2	87	11- <i>O</i> -Acetyl-9- <i>O</i> -demethylmaritidin	6,04	140
8- <i>O</i> -Demethylmaritidin*	28,0	126	8-Hydroxy-9-methoxykrinin	6,92	142
Powellin*	29,1	143	6-Hydroxymaritidine (směs α a β izomeru)	10,53	144
Zephykarinatin I	35,61	81	1- <i>O</i> -Acetylkaranin	11,7	145
Lykoramin	40,12	63	Undulatin	33,9	145
Galanthamin^a	1,07	138	Augustin	45,26	38
Eserin^a	0,063	126	Oxoassoanin	47,21	138

^astandardy

*k měření těchto látek byla použita lidská AChE (*hAChE*), ostatní alkaloidy byly měřeny na AChE z *Electrophorus electricus*

Schopnost inhibovat butyrylcholinesterázu byla testována jen u malého počtu AAs, není tedy možné odvodit vztah mezi strukturou AAs a jejich inhibiční aktivitou vůči BuChE. Téměř všechny studie zabývající se touto inhibicí byly provedeny naší výzkumnou skupinou. Z dosavadních dat lze usuzovat, že nejslibnější inhibiční účinky vůči BuChE vykazují alkaloidy belladinového, karltoninového a narcikachninového strukturního typu^{20, 26, 69, 143} (Tab. 4).

Tabulka 4: Inhibiční aktivita vybraných Amaryllidaceae alkaloidů vůči BuChE

Sloučenina	IC ₅₀ (μM)	Ref.
Karltonin B	0,031 ± 0,001	26
Karltonin A	0,91 ± 0,02	26
Narcimatulin	5,9 ± 0,2	20
Karltonin C	14,8 ± 1,1	26
Narcipavlin	24,4 ± 1,2	69
4'- <i>O</i> -Demethylbelladine	30,7 ± 4,0	143
6- <i>O</i> -Demethylbelladin	115,7 ± 10,1	143
Galanthamin^a	42 ± 1	26
Eserin^a	0,13 ± 0,01	26

^astandard

Jednou z neuropatologických charakteristik AD je přítomnost neurofibrilárních klubek (NFTs), která jsou tvořena spárovanými helikálními vlákny hyperfosforylovaného τ -proteinu. τ -Protein je fyziologicky rozpustný a zodpovídá za zesíťování mikrotubulů a stabilizaci cytoskeletu neuronů. Funkce τ -proteinu je regulována jeho fosforylací a defosforylací prostřednictvím kináz, z nichž zásadní postavení má glykogen syntáza kináza-3 (GSK-3). Hyperfosforylovaný τ -protein tvoří vlákna, která agregují v NFTs. NFTs narušují axonální transport a blokuji normální metabolismus neuronů, což vede k jejich odumírání. τ -Protein získaný z mozku pacientů trpících AD má 40 fosforylačních míst, většina z nich může být ovlivněna právě enzymem GSK-3. Tato skutečnost z tohoto enzymu dělá další potenciální cíl při hledání léčiv na AD^{146, 147}. U některých AAs byla studována jejich schopnost inhibovat tento enzym. Bylo otestováno 28 látek patřících do sedmi strukturních typů, v následující tabulce jsou shrnuty AAs, u kterých inhibice při testované koncentraci 50 μ M přesáhla 50 procent a bylo možné stanovit hodnotu IC_{50} ¹⁴⁸ (Tab. 5).

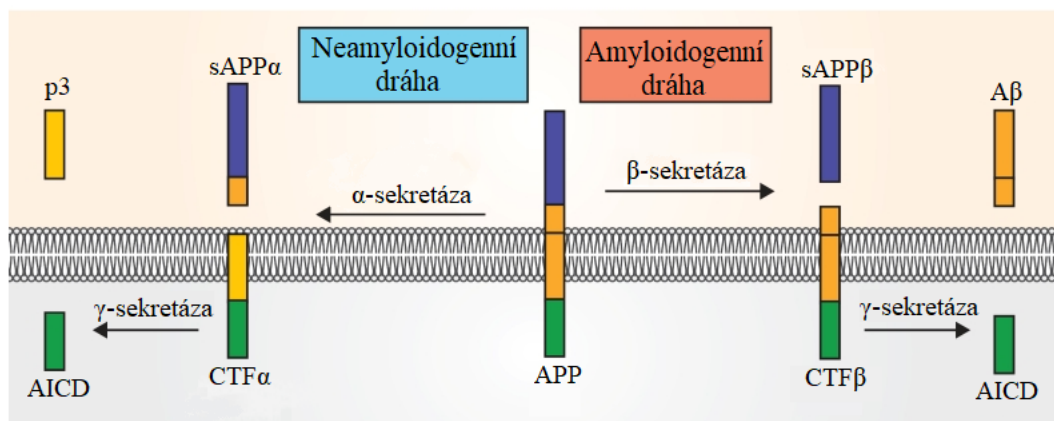
Tabulka 5: Inhibiční aktivita vybraných Amaryllidaceae alkaloidů vůči GSK-3 β

Sloučenina	Míra inhibice (%) při koncentraci 1 mM	IC_{50} (μ M)
Karanin	61,8 \pm 9,2	30,75 \pm 0,04
9-O-Demethylhomolykorin	63,6 \pm 1,3	30,00 \pm 0,71
Masonin	66,0 \pm 4,0	27,81 \pm 0,05
SB-415286^a	-	70 nM

^alátko SB-415286 (syntetický derivát arylindomaleinamidu) byla použita jako standard

K vysvětlení podstaty AD přispívá dále hypotéza amyloidní kaskády, podle níž je ukládání beta-amyloidu ($A\beta$) jedním z klíčových patogenetických faktorů vzniku AD. $A\beta$ je produktem proteolytického štěpení transmembránového vysokomolekulárního proteinu APP (amyloidní prekurzorový protein). Za toto štěpení jsou zodpovědné enzymy α -, β - nebo γ -sekretáza. Za fyziologických podmínek je APP štěpen α -sekretázou, dochází k uvolnění sAPP α (solubilních fragmentů APP po štěpení α -sekretázou), proto je tato cesta označována jako neamyloidogenní^{149, 150}. Amyloidogenní dráha je katalyzována β -sekretázou (BACE1). Po štěpení BACE jsou generovány fragmenty s terminální aminokyselinovou doménou sAPP β (solubilní APP po štěpení β -sekretasou) a fragment β -CTF (C-terminální fragment po štěpení β -sekretasou). Následuje ještě jedno štěpení prostřednictvím γ -sekretasy a vzniká amyloid- β 40 ($A\beta$ 40) nebo amyloid- β 42 ($A\beta$ 42)^{150, 151} (Obr. 29). Problémem je toxická, vysoce agregabilní forma $A\beta$ 42. Vzniklý $A\beta$ se ukládá extracelulárně v neuronální tkáni a vede ke vzniku tzv. senilních plaků. Sekundárně dochází k zánětlivým a oxidativním procesům a ireverzibilnímu

poškození tkáně. A β se neukládá jen v extracelulárních prostorech šedé hmoty mozkové, ale postihuje i mozkové cévy^{149, 150}. Z uvedeného vyplývá, že β - a γ -sekretáza představují potenciální cíle pro vývoj nových léčiv, které by se uplatnily v terapii AD. Nicméně γ -sekretáza se v organismu účastní celé řady pochodů a její inhibicí dochází k celé řadě závažných nežádoucích účinků¹⁵², je tedy logickým krokem hledat především inhibitory BACE1.



Obrázek 29: Schéma vzniku amyloidu- β ¹⁵³

Prolyloligopeptidáza (POP) je proteáza, která štěpí molekuly obsahující ve své struktuře prolin. Tento enzym se hojně vyskytuje v mozku i na periférii, ale jeho fyziologický význam nebyl dosud zcela objasněn, zřejmě sehrává roli v procesech učení a paměti. Poslední dobou je POP spojována se zánětlivými a neurodegenerativními procesy (AD, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba a roztroušená skleróza), neboť u pacientů s těmito onemocněními byla *post-mortem* pozorována změna v aktivitě POP¹⁵⁴. Bylo zjištěno, že u pacientů s AD se tento enzym nachází spolu s amyloidními plaky a fosforylovaným τ -proteinem. Jakou roli sehrává POP při tvorbě A β se nepodařilo objasnit. V jedné studii byl proveden screening proteáz, které jsou schopné generovat A β z APP, ve studii byla zahrnuta i POP. Vzhledem k tomu, že POP štěpí pouze molekuly do určité velikosti, je nepravděpodobné že by POP mohla štěpit APP *in vivo*. Nicméně po podání inhibitoru POP Y-29794 došlo k významnému poklesu fragmentů A β (1–16). Ačkoliv byly výsledky slibné, nebyly provedeny další studie a tento mechanismus se tedy nepodařilo objasnit. Je zajímavé, že i když byla POP široce studována jako možný terapeutický cíl v léčbě AD, tak souvislosti mezi POP a τ -proteinem prozatím nebylo věnováno mnoho pozornosti. Podle nedávných ko-lokalizačních studií provedených na vzorcích mozkové tkáně pacientů s AD *post-mortem*, existuje možnost, že by se POP mohla podílet na agregaci τ -proteinu¹⁵⁵. U řady AAs byla zjišťována schopnost inhibovat POP. Alkaloidy s hodnotou IC₅₀ do 500 μ M jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. 6).

Tabulka 6: Inhibiční aktivita vybraných Amaryllidaceae alkaloidů vůči POP

Sloučenina	IC ₅₀ (μM)	Ref.
Buphanidrin	370 ± 40	143
4- <i>O</i> -Demethylbelladin	370 ± 30	143
Karltinin A	143 ± 12	26
1- <i>O</i> -Acetyllykorin	450 ± 50	143
Zephyranthin	142 ± 10	156
Homolykorin	173 ± 34	69
Odulin	252 ± 17	69
Masonin	314 ± 34	20
Norlykoramin	209 ± 14	69
Narcimatulin	29,2 ± 10	20
Lykosinin B	258 ± 14	26
Berberin^a	142 ± 21	26

^astandard

3.3.2 Amaryllidaceae alkaloidy a nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou celosvětově druhou nejčastější příčinou úmrtí, v roce 2018 podle toho tomuto onemocnění odhadem 9,6 milionu lidí. U mužů je nejčastěji diagnostikována rakovina plic, prostaty, tlustého střeva, žaludku a jater, zatímco u žen je nejčastější formou rakovina prsu, tlustého střeva, plic, děložního čípku a štítné žlázy¹⁵⁷. Pojem rakovina je označení pro celý soubor onemocnění, která vznikají na základě nekontrolovatelného dělení buněk. Molekulární podstatou tohoto narušení regulace buněčné proliferace je mutace DNA a epigenetické změny. Mutace mohou být vyvolány různými biologickými (infekce), chemickými (mutageny, kancerogeny), fyzikálními (rentgenové záření, gama záření) a hormonálními vlivy. Obvykle jsou zasaženy geny, jež jsou klíčové v regulaci buněčné proliferace: protoonkogeny, tumor-supresorové geny nebo mutátorové geny. Existuje více než 100 typů tohoto onemocnění, které je obvykle pojmenováno podle zasaženého orgánu (rakovina prsu, rakovina plic apod.) nebo tkáně (karcinomy, sarkomy, lymfomy, leukémie a další). Při léčbě rakoviny se lze setkat s několika terapeutickými přístupy. Nejčastěji se jedná o chirurgické odstranění nádoru, radioterapii, chemoterapii nebo jejich vzájemné kombinace¹⁵⁸. V současnosti jsou na trhu k dispozici zástupci ze čtyř skupin protinádorových léčiv rostlinného původu: vinka alkaloidy (vikristin, vinblastin a polysynteticky připravené vinorelbin a vinflumin), deriváty podofylotoxinu (etoposid), deriváty kamptotecinu (topotekan, irinotekan) a taxany (paklitaxel a polysynteticky upravený docetaxel)¹⁵⁹. Rozvoj rezistence nádorových buněk vůči používaným léčivům, často s různým mechanismem účinku, představuje závažný problém. Proto je důležité soustředit se na hledání nových protinádorových látek. V tomto ohledu jsou

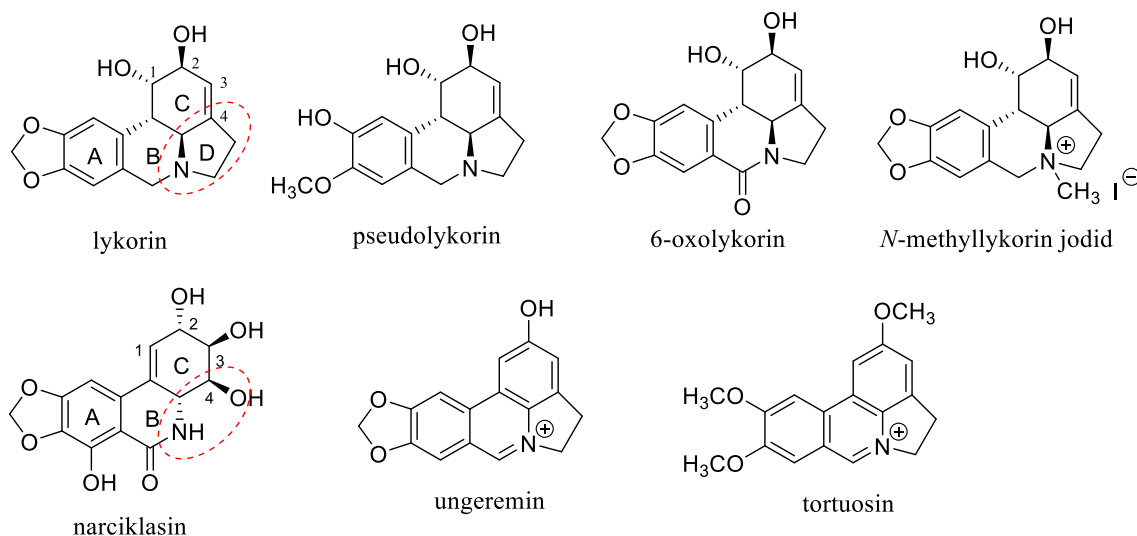
látky přírodního původu nezastupitelné, neboť se často jedná o strukturně jedinečné molekuly, které poskytují nový mechanismus účinku¹⁶⁰.

Mezi jeden z nejvýznamnějších účinků AAs patří jejich protinádorová aktivita. Výraznou výhodou je selektivita některých látek pro nádorové buňky a relativně nízká toxicita k zástupcům zdravých buněk¹⁶¹. Mnoho rostlin rodu *Zephyranthes* se v lidovém léčitelství využívalo k léčbě nádorových onemocnění. Řada z nich byla fytochemicky studována s cílem objasnit, které látky jsou za tyto protinádorové účinky zodpovědné⁹ (Tab. 7). Do dnešní doby bylo podrobena screeningu více než 50 alkaloidů izolovaných z rodu *Zephyranthes*. Již od roku 1964 je známo, že extrakt *Z. candida* inhibuje růst nádorových buněk, ale až o 30 let později bylo popsáno, že za účinek zodpovídá *trans*-dihydronarciklasin⁷⁵. Dodnes bylo v souvislosti s možnými protinádorovými účinky testováno 16 alkaloidů ze *Z. candida* na pěti nádorových liniích, nejaktivnějšími látkami byly *trans*-dihydronarciklasin, *N*-methylhaemanthidin chlorid, haemanthamin, *N*-fenylnkrinasiadin a zephykandidin A^{76, 79}. Obdobným způsobem bylo hodnoceno 15 alkaloidů izolovaných ze *Z. carinata*. Ze studie vyšly jako nejaktivnější alkaloidy narciklasinového typu pankratistatin, 1-*O*-(3-hydroxybutyryl)pankratistatin a 1-*O*-(3-*O*-β-D-glukopyranosylbutyryl)pankratistatin^{82, 83}. V rámci druhu *Z. minuta* bylo hodnoceno téměř 20 alkaloidů na čtyřech buněčných liniích, zde se projevíly jako nejzajímavější lykorin, haemanthamin, pankratistatin a 1-*O*-(3-hydroxybutyryl)pankratistatin. Za zmínku stojí rovněž aktivita některých alkaloidů plikaminového strukturního typu, nejaktivnější jsou alkaloidy s keto skupinou na C6 zephygranditin A a zephygranditin B s hodnotami IC₅₀ v rozmezích 9,2 až 10,6 μM a 12,4 až 13,9 μM^{62, 90}.

V kontextu protinádorové aktivity AAs si získaly nejvíce pozornosti látky lykorinového, haemanthaminového a narciklasinového typu, neboť vykázaly velmi slibné účinky na celé řadě nádorových linií⁹. Vzhledem k velkému množství testovaných alkaloidů bylo možné u těchto strukturních typů odvodit některé vztahy mezi strukturou a aktivitou.

Alkaloidy lykorinového strukturního typu

Doposud bylo hodnoceno přes 100 různých alkaloidů lykorinového typu na širokém spektru nádorových linií, z dostupných údajů je tedy možné odvodit některé vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou. S jistotou lze tvrdit, že pyrrolofenanthridinová kostra je pro cytotoxickou aktivitu zcela zásadní, neboť narušením této struktury dojde ke ztrátě aktivity⁹. Zaměříme-li se na kruh A, tak z porovnání lykorinu a pseudolykorinu (screening na 17 buněčných liniích) vyplývá, že dioxalanový kruh přispívá k cytotoxické aktivitě. Zavedení oxo- skupiny do polohy C6 (6-oxolykorin) a kvarternizace atomu dusíku v kruhu B (*N*-methyllykorin) představují změny, které naopak vedou k poklesu aktivity. Ze sledování strukturních změn v kruhu C lze také udělat několik závěrů. Pro účinek je nezbytná dvojná vazba mezi uhlíky C3 a C4, substituenty s obsaženým kyslíkem v polohách C1 a C2 jsou pro účinek rovněž výhodné. Aromatizace kruhu C vede k cytotoxicky aktivnějším látkám (ungeremin, tortuosin). Význam pyrrolového kruhu D pro výslednou aktivitu je obtížné posoudit, neboť nejúčinnějším látkám, které spadají do narciklasinového typu, tento kruh chybí⁹ (Obr. 30, Obr. 32).

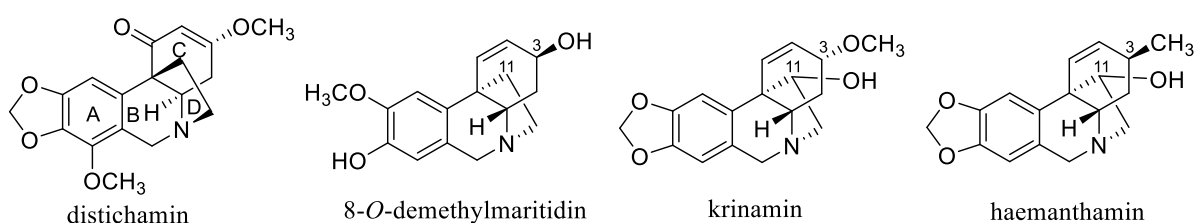


Obrázek 30: Alkaloidy lykorinového typu s významným cytotoxickým účinkem

Alkaloidy haemanthaminového strukturního typu

V rámci celé řady prací bylo do dnešní doby studováno 60 alkaloidů haemanthaminového a krininového typu na 54 nádorových liniích⁹. Z těchto studií vzešlo několik poznatků o strukturních detailech protinádorového farmakoforu těchto alkaloidů (Obr. 31). Pro účinek je nezbytné intaktní fenanthridinové jádro, jeho narušením získáme molekuly s výrazně nižší aktivitou, a přítomnost 5,10b-ethanového můstku, který je v konfiguraci α (alkaloidy

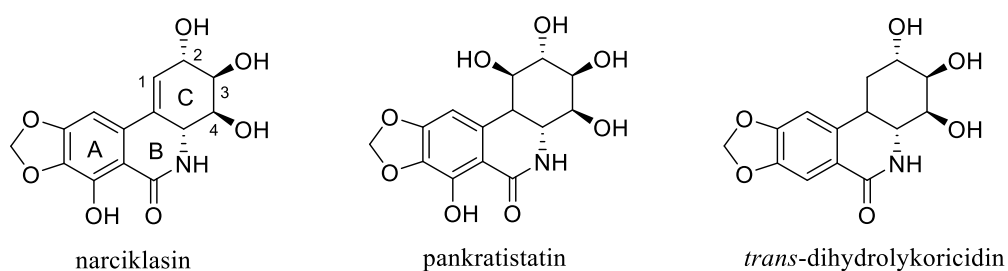
haemanthaminového typu). Alkaloidy s β konfigurací tohoto můstku (alkaloidy krininového typu) disponují výrazně nižší cytotoxickou aktivitou, jedinou výjimku představuje distichamin^{162, 163}. Pro cytotoxickou aktivitu je dále výhodná methylenedioxy skupina v kruhu A, neboť jiné substituenty vedou k látkám s nižší aktivitou (8-*O*-demethylmaritidin). Ukázalo se, že modifikace kruhu B, jako kvarternizace atomu dusíku, vedou k poklesu aktivity. Malý substituent se schopností tvořit vodíkové vazby v poloze C11 vede naopak ke zvýšení aktivity (krinamin). Stereochemie substituentů na C3 výrazně neovlivní výslednou aktivitu těchto látek (haemanthamin, krinamin)⁹.



Obrázek 31: Alkaloidy krininového a haemanthaminového typu přispívající k objasnění vztahu struktura-aktivita ve vztahu k nádorovým onemocněním

Alkaloidy narciklasinového strukturního typu

I když se tyto alkaloidy vykytují v rostlinném materiálu vzácně, podařilo se izolovat pankratistatin a narciklasin v množství potřebném pro základní screening cytotoxicity. Omezené množství těchto látek v přírodních zdrojích bylo kompenzováno jejich syntézou, která umožnila získat tyto látky v množství potřebném pro podrobnější studie. Dosud bylo publikováno přes 40 prací zaměřujících se na syntézu pankratistatinu a narciklasinu⁹.



Obrázek 32: Alkaloidy narciklasinového typu s významným cytotoxickým účinkem

Pro účinnost těchto molekul je nutné netknuté tricyklické jádro a 8,9-methylenedioxy skupina na kruhu A, jiné substituenty v těchto polohách vedou k poklesu aktivity. Oxo- skupina na uhlíku C6 také zvyšuje cytotoxickou aktivitu těchto látek. Ve snaze připravit aktivní polosyntetické deriváty byly připraveny deriváty s různými substituenty na kruhu C. Na základě dosavadních výsledků lze tvrdit, že pro aktivitu jsou dále důležité malé polární substituenty se

schopností tvořit vodíkové vazby. Pro aktivitu je nezbytné, aby byla zachována dihydroxylová substituce na uhlících C2/C3 nebo na C3/C4. U derivátů je dále nezbytné zachovat stereochemii kruhu C původních alkaloidů. Pro aktivitu narciklasinu je potřebná dvojná vazba mezi uhlíky C1 a C10b, neboť aktivita dihydro-derivátů narciklasinu (*trans*-dihydrolykoricidin) byla výrazně nižší⁹ (Obr. 32).

Tabulka 7: Hodnoty IC₅₀ vybraných Amaryllidacea alkaloidů izolovaných v rámci rodu *Zephyranthes*

Sloučenina	Nádorová linie (IC ₅₀ , μM)												Ref.
	HL-60	K562	A-549	HepG2	HT-29	HeLa	KB	SiHa	A375	SK-MEL	WM278	MeWO	
<i>N</i> -Methylhaemanthidine chlorid	0,91	1,0	1,1	1,5	1,2								76
Haemanthamin	1,4	2,5	2,5	4,8	2,1		21,1	22,4					76, 89
<i>N</i> -Ethoxykrinasiadin	20	10	39	14	28								76
<i>N</i> -Ethoxykarbonylkrinasiadin	11	5,8	26	21	21								76
<i>N</i> -Fenylkrinasiadin	0,8	0,7	13	1,4	2,3								76
Lykorin	1,6	2,3	1,9	3,7	3,2		42,7	22,8					76, 89
Zephykandidin A	1,98		8,9										79
Pankratistatin						12	5,2						82
HBP						4,5	1,8						82
GBP						41	11						82
Zephygranditin A									9,5	9,3	9,2	9,9	62
Zephygranditin B									12,4	14,8	12,6	12,9	62
Zephygranditin C									15,8	14,8	12,6	12,9	62

HL-60 (promyelocytární leukémie), K562 (myelogenní leukémie), A549 (adenokarcinom plic), HepG2 (hepatocelulární karcinom), HT-29 (adenokarcinom střeva), HeLa (adenokarcinom děložního čípku), KB (epidermální karcinom), SiHa (karcinom děložního čípku), A375 (melanom), SK-MEL (melanom), VM278 (melanom), MeWO (melanom), HBP (1-*O*-(3-hydroxybutyryl)pankratistatin, GBP (1-*O*-(3-*O*-β-D-glukopyranosylbutyryl)pankratistatin)

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie, materiál a instrumentální vybavení pro izolaci alkaloidů

4.1.1 Chemikálie a rozpouštědla

- Vodný roztok amoniaku 22-25% p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (NH_4OH)
- Diethylamin p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (DEA)
- Dusičnan bismutitý zásaditý (Lachema, Brno) ($\text{BiNO}_3(\text{OH})_2 \cdot \text{BiO}(\text{OH})$)
- Hydroxid sodný č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (NaOH)
- Chlorid rtuťnatý p. a. (Fisher Scientific, Pardubice) (HgCl_2)
- Jodid draselný č. (Lach-Ner, Neratovice) (KI)
- Kyselina hexachloroplatičitá hydrát (Sigma Aldrich, Praha) ($\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot x \text{H}_2\text{O}$)
- Kyselina chlorovodíková 35% p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (HCl)
- Kyselina mravenčí 98% p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (CH_2O_2)
- Kyselina sírová 96% p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (H_2SO_4)
- Kyselina vinná p. a. (Balex, Pardubice) ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$)
- Kyselina trifluoroctová pro HPLC (Sigma Aldrich, Praha) ($\text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$)
- Uhličitan sodný bezvodý č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na_2CO_3)
- Aceton p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) ($\text{C}_2\text{H}_6\text{CO}$)
- Acetonitril HPLC gradient (Lach-Ner, Neratovice) (CH_3CN)
- Benzin lékařský RN vyhovující ČL a ČSN 656544 (Ing. Švec – Penta, Praha) (Bz)
- Cyklohexan č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (C_6H_{12})
- Dichlormethan (Ing. Švec – Penta, Praha) (CH_2Cl_2)
- Diethylether p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$)
- Dioxan p. a. (Lach-Ner, Neratovice) ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$)
- Ethanol 95% (Lihovar Chrudim, Chrudim) ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)
- Ethylester kyseliny octové č. (Ing. Švec – Penta, Praha) ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$)
- Chloroform č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (CHCl_3)
- Chloroform deuterizovaný pro NMR analýzu – Chloroform-d 99,8 atom % D (Sigma Aldrich, Praha) (CDCl_3)
- Methanol p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (CH_3OH)
- Methanol deuterizovaný pro NMR analýzu – Methanol-d4 99,8 atom % D (Sigma Aldrich, Praha) (CD_3OD)
- Methanol HPLC (J. T. Baker, Denver, Netherlands) (CH_3OH)

- n-Hexan (Ing. Švec – Penta, Praha) (C₆H₁₄)
- Tetrahydrofuran p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (C₄H₈O)
- Toluen p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (C₆H₅CH₃)
- Voda superčistá

4.1.2 Vytvářecí soustavy použité při tenkovrstvé chromatografii

V následující tabulce jsou uvedeny mobilní fáze, které byly použity při analytické a preparativní tenkovrstvé chromatografii v průběhu izolace (Tab.8).

Tabulka 8: Přehled mobilních fází použitých při TLC

Mobilní fáze	Složení
S1	Benzin : CHCl ₃ ^a : DEA ^b (90 : 30 : 5)
S2	cHx ^c : DEA (90 : 10)
S3	cHx : EtOAc ^d : DEA (8 : 1 : 1)
S4	cHx : Me ₂ CO ^e : NH ₃ ^f (10 : 90 : 2)
S5	cHx : CHCl ₃ : EtOH ^g : DEA (75 : 20 : 10 : 5)
S6	cHx : EtOAc : IPA ^h : DEA (85 : 15 : 2 : 2)
S7	cHx : EtOAc : IPA : DEA (45 : 45 : 5 : 5)
S8	cHx : EtOAc : IPA : DEA (20 : 70 : 10 : 5)
S9	cHx : EtOAc : MeOH ⁱ : DEA (60 : 30 : 5 : 5)
S10	cHx : EtOAc : MeOH : DEA (30 : 60 : 10 : 5)
S11	cHx : Me ₂ CO : EtOH : DEA (40 : 40 : 6 : 2)
S12	To ^k : DEA (98 : 2)
S13	To : DEA (90 : 10)
S14	To : CHCl ₃ : DEA (70 : 25 : 5)
S15	To : EtOAc : DEA (60 : 30 : 10)
S16	To : EtOH : DEA (85 : 10 : 5)
S17	To : EtOH : DEA (70 : 30 : 5)
S18	To : CHCl ₃ : EtOH : DEA (80 : 50 : 30 : 5)
S19	To : Me ₂ CO : EtOH : NH ₃ (40 : 80 : 4 : 2)
S20	To : Me ₂ CO : EtOH : NH ₃ (20 : 70 : 10 : 2)
S21	CH ₂ Cl ₂ ^l : MeOH : NH ₃ (60 : 30 : 0,2)
S22	EtOAc : AcN ^m : TFAA (40 : 10 : 0,1)
S23	EtOAc : MeOH : DEA (90 : 10 : 5)
S24	EtOAc : MeOH : DEA (70 : 30 : 5)
S25	EtOAc : MeOH : NH ₃ (100 : 8 : 3)
S26	EtOAc : MeOH : H ₂ O ⁿ (90 : 10 : 5)
S27	EtOAc : MeOH : H ₂ O (100 : 13 : 10)
S28	EtOAc : MeOH : H ₂ O (85 : 15 : 10)
S29	Me ₂ CO : MeOH : NH ₃ (90 : 7 : 3)
S30	THF ^o : MeOH : H ₂ O (100 : 13 : 10)
S31	IPA : DEA (9 : 1)
S32	IPA : H ₂ O : TFAA ^p (90 : 10 : 0,2)
S33	MeOH : H ₂ O : TFAA (60 : 40 : 0,2)

^achloroform ^bdiethylamin ^ccyklohexan ^dethylacetát ^eaceton ^famoniak ^gethanol ^hisopropanol ⁱmethanol ^ktoulen ^ldichlormethan ^macetonitril ⁿvoda ^otetrahydrofuran ^pkyselina trifluoroctová

4.1.3 Adsorbenty pro chromatografii

Adsorbenty pro tenkovrstvou chromatografii

- Komerční analytické TLC desky Silica gel 60 GF₂₅₄ for TLC (Merck Millipore, Praha) o rozměrech 20 × 20 cm. Pro analytické účely byly použity desky o výšce 10 cm a variabilní šířce podle počtu analyzovaných vzorků a pro preparativní TLC byly použity desky o rozměru 10 × 20 cm.
- Komerční analytické desky s reverzní fází Silica gel C18 on TLC Plates (Merck Milipore, Praha) o rozměrech 20 × 20 cm. Pro analytické účely byly použity desky o výšce 10 cm a variabilní šířce podle počtu analyzovaných vzorků a pro preparativní TLC byly použity desky o rozměru 10 × 20 cm.
- Komerční analytické desky Aluminum oxide on TLC-plates (Merck Milipore, Praha) o rozměrech 20 × 20 cm. Desky o rozměru 10 × 2,5 cm byly použity pro predikci mobilních fází na sloupcovou chromatografii a na flash chromatografii.
- Pro přípravu litých vrstev byl použit silikagel: Silica gel 60 GF254 (Merck Millipore, Praha). Na přípravu desky o rozměrech 15 x 15 cm bylo použito 6,5 g adsorbentu a 22,4 ml vody (28,89 mg/cm²).

Adsorbenty pro sloupcovou chromatografii a flash chromatografii

- Oxid hlinitý (Al₂O₃) neutrální, pro chromatografii, 63–200 μm; Across (Lach-Ner, Neratovice) byl před použitím promyt směsí CHCl₃:EtOH (1:1) a vysušen při laboratorní teplotě. Posléze byl aktivován při teplotě 200 °C po dobu 12 hodin. Zchladlý aktivovaný oxid hlinitý byl následně deaktivován přidávkem 6 % vody a ekvilibrován v uzavřené nádobě po dobu 1 hodiny.
- Silica gel pro flash chromatografii, 40-63 μm, porozita 60 Å (Sigma Aldrich, Praha). Adsorbent byl použit jako stacionární fáze do kolon pro flash chromatografii a na přípravu triturací vzorků.
- Reverzní fáze pro flash chromatografii (octadecyl-functionalized silica gel 200-400 mesh), 37-74 μm (Sigma Aldrich, Praha). Adsorbent byl použit na přípravu triturací vzorků při separaci na reverzní fázi během flash chromatografie.
- Oxid hlinitý (Al₂O₃) neutrální, pro flash chromatografii, 32-63 μm; Across (Lach-Ner, Neratovice) byl před použitím promyt směsí CHCl₃:EtOH (1:1) a vysušen při laboratorní teplotě. Posléze byl aktivován při teplotě 200 °C po dobu 12 hodin.

4.1.4 Detekční činidla

Dragendorffovo činidlo (podle Muniera) bylo připraveno jako zásobní roztok smísením roztoku A (1,7 g bazického dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné rozpuštěné v 80 ml vody) a roztoku B (roztok 32 g KI v 80 ml vody) v objemovém poměru 1:1. Detekční roztok byl připraven smísením 10 g kyseliny vinné rozpuštěné v 50 ml vody s 5 ml zásobního roztoku. Zásobní roztok i postřikové činidlo byly uchovávány v chladničce při teplotě 4 °C.

Hexachloroplatičité činidlo bylo připraveno smísením roztoku A (100 mg hydrátu hexachloroplatičité kyseliny bylo rozpuštěno v 1 ml vody) a roztoku B (6 g jodidu draselného bylo rozpuštěno ve 100 ml vody). Postřikové činidlo bylo uchováváno při teplotě 4 °C v chladničce.

Mayerovo činidlo bylo připraveno rozpuštěním 5 g KI ve 30 ml vody a do vzniklého roztoku bylo přidáno 1,35 g práškovaného chloridu rtuťnatého. Vzniklá sraženina byla míchána do rozpuštění, vzniklý roztok je bezbarvý nebo světle žlutý. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4 °C.

4.1.5 Pomocný materiál

- Křemelina Celite C 535 John's Manville (Sigma Aldrich, Praha), pro preparativní práci byla extrahována vodou a vysušena.
- Sušící perly silikagelu (Ing. Švec – Penta, Praha)
- Síran sodný bezvodý p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na_2SO_4)

4.1.6 Přístroje

- Spektrometr EI/MS na GC/MS systému Agilent 7890A GC 5975 inertní MSD; EI mód 70 eV; kolona HP-5 MS (30m x 0.25 mm x 0.25 μm) (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)
- Detektor diodového pole (Waters 2998 Photodiode array detector) a hmotnostní detektor (Waters Acquity qDa detector) na autopurifikačním HPLC systému (Waters Autopurification™ HPLC-MS systém; Milford, USA)
- Flash chromatografický systém BÜCHI Sepacore flash system X10 opatřený kontrolní jednotkou BÜCHI C-620, sběračem frakcí BÜCHI C-660, detektorem UV C-640 a pumpou BÜCHI C-605

- Spektrometr ESI/HRMS, Waters Synapt G2Si s hybridním analyzátozem quadrupole time-of-flight (Q-TOF) připojený na Waters Acquity I-Class UHPLC Systém (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA)
- Spektrometr Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, California, USA)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlin, Germany)
- Vakuová odparka pro poloprovozní použití Laborota 20 Heidolph (Heidolph, Schwabach, Germany)
- Vakuová odparka Buchi Rotavapor R-114 (Buchi Labortechnik AG, Switzerland).
- Polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Hamburg, Germany)

4.1.7 Databáze použité pro vyhodnocování výsledků

Knihovna EI-MS spekter NIST Virtual Library 2017 (NIST, Gaithersburg, Maryland, USA).

4.2 Chemikálie, materiál a instrumentální vybavení pro stanovení biologických aktivit

4.2.1 Chemikálie pro stanovení biologických aktivit

- Acetylthiocholin jodid p. a. (Sigma Aldrich, Praha) (ATChI)
- Berberin hydrochlorid (Sigma Aldrich, Praha) (C₂₀H₁₈NO₄Cl)
- Butyrylthiocholin jodid p. a. (Sigma Aldrich, Praha) (BuTChI)
- Diethylether p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Et₂O)
- Dihydrogenfosforečnan draselný bezvodý p. a. (Lach-Ner, Neratovice) (KH₂PO₄)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (NaH₂PO₄ * 2H₂O)
- Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma Aldrich, Německo) (C₂H₆OS)
- 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina ≥ 98% (Sigma Aldrich, Praha) (C₁₄H₈N₂O₈S₂)
- Ethylester kyseliny octové p. a. (Sigma Aldrich, Německo) (C₄H₈O₂)
- Galanthamin hydrobromid > 98% (Changsha Organic Herb Inc., People Republic of China) (C₁₇H₂₁NO₃)
- Glukosa-6-fosfát (Sigma Aldrich, Německo) (C₆H₁₃O₉P)
- Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (Roche, Německo)
- Hydrogenfosforečnan disodný bezvodý p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na₂HPO₄)
- Huperzin A 98% (Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., People Republic of China) (C₁₅H₁₈N₂O)
- Chlorid draselný p. a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (KCl)

- Chlorid sodný p. a. (Lachema, Brno) (NaCl)
- NADPH (Sigma Aldrich, Německo)
- Oracin (Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, Česká republika) (C₂₀H₁₈N₂O₃)
- Z-Gly-Pro-p-nitroanilid ≥ 99% (Sigma Aldrich, Praha) (C₁₃H₁₆N₄O₄)
- Z-Pro-prolinal ≥ 98% (Sigma Aldrich, Praha) (C₁₈H₂₂N₂O₄)

4.2.2 Pufry

5mM Fosfátový pufr o pH 7,4 byl připraven smísením 57 ml roztoku A a 283 ml roztoku B a 300 ml vody. Zásobní roztok A je 10 mM roztok NaH₂PO₄ (v 1 litru roztoku je obsaženo 1,20 g NaH₂PO₄). Zásobní roztok B je 10 mM roztok Na₂HPO₄ (v 1 litru roztoku je obsaženo 1,42 g NaH₂PO₄).

5mM Fosfátový pufr o pH 7,4 obsahující 150 mM chloridu sodného (8,766 g chloridu sodného p. a. se rozpustí v 5mM fosfátovém pufru pH 7,4 a doplní se jím do 1000 ml).

100mM Fosfátový pufr o pH 7,4 byl připraven smísením 57 ml roztoku A a 243 ml roztoku B a 300 ml vody. Zásobní roztok A je 200 mM roztok NaH₂PO₄ (v 1 litru roztoku je obsaženo 24,0 g NaH₂PO₄). Zásobní roztok B je 200 mM roztok Na₂HPO₄ (v 1 litru roztoku je obsaženo 28,4 g Na₂HPO₄).

PBS: 100mM Na/K fosfátového pufru pH 7,4 obsahující 137 mM NaCl a 2,7 mM KCl – roztok A byl připraven smísením 0,68 g KH₂PO₄ a 1,5 g NaCl a rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. Roztok B byl připraven rozpuštěním 0,89 g NaH₂PO₄ * 2 H₂O a 1,5 g NaCl ve 100 ml destilované vody. Následně bylo smícháno 20 ml roztoku A a 100 ml roztoku B. Hodnoty pH byly kontrolovány u všech pufrů na kalibrovaném pH metru PHM 220.

4.2.3 Přístroje

- Microplate ELISA reader EL800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, USA)
- Mikrotitrační destičky 96 jamek (Fisher Scientific, Pardubice)
- Odstředivka AVANTI J-301 s rotorem JA-30.50 (Beckman Coulter, Brea, USA)
- Odstředivka Boeco U-32R (Boeco, Hamburg, Germany) s rotorem Hettich 1611 (Hettich, Tuttlingen, Germany)
- pH metr PHM 220 (Radiometer, Copenhagen, Denmark)
- Polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Hamburg, Germany)
- Reader Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- CD spektropolarimetr Jasco J-815 (Jasco, Německo)

- Statistický program GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2006)

4.2.4 Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE

Roztok 5mM DTNB byl připraven přímým rozpouštěním příslušného množství DTNB v 100 mM fosfátovém pufru pH 7,4. Roztok smí být jen slabě nažloutlý. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4 °C po dobu maximálně 1 týdne.

Roztok 10mM ATChI byl připraven rozpuštěním příslušného množství látky ve vodě. Roztok musel být čirý. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4 °C po dobu maximálně 1 týdne.

Roztok 10mM BuTChI byl připraven stejným postupem jako roztok ATChI.

4.2.5 Činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči POP

Roztok 10mM Z-Gly-Pro-p-nitroanilidu byl připraven rozpuštěním příslušného množství látky v 40% 1,4-dioxanu. Činidlo bylo uchováváno v chladničce při 4 °C.

4.3 Metody

4.3.1 Obecné postupy

Příprava rozpouštědel

Všechna komerční rozpouštědla (kromě rozpouštědel deklarovaných čistotou pro HPLC, LC/MS a NMR) byla před použitím standardně destilována. Destilát byl jímán podle příslušných tabelárních teplot varu jednotlivých rozpouštědel.

Odpařování extraktů a frakcí

Pro odpaření spojených sumárních ethanolických extraktů pro izolaci alkaloidů byla použita poloprovozní vakuová odparka Laborota 20 Heidolph s teplotou vodní lázně 40–50 °C, podle použitého rozpouštědla, a tlakem 1,33 kPa. Eluáty získané během sloupcové chromatografie sumárního alkaloidního extraktu a posléze během dělení jednotlivých frakcí pomocí metod preparativní TLC byly odpařeny do sucha na vakuové odparce Büchi Rotavapor R-114 na vodní lázni s teplotou nastavenou v závislosti na odpařovaném rozpouštědle.

Detekce alkaloidů v roztoku

Během vytřepávání alkaloidního extraktu z vodné fáze byla přítomnost alkaloidů ve vodné fázi ověřována pomocí Mayerova činidla. Roztok zkoumaného vzorku byl okyselen pomocí

2% HCl (na pH 3 až 4). Tento roztok byl ve zkumavce smíchán s několika kapkami činidla, obsahoval-li zkoumaný roztok alkaloidy, objevil se výrazný bílý zákal.

Sušení extraktů a frakcí, izolovaných látek a jejich skladování

Alkaloidní extrakt, jeho frakce i izolované chemicky čisté látky byly vysušeny ve vakuovém exsikátoru (vakuum přibližně 1,33 kPa) nad sušícími perlami silikagelu po dobu minimálně 24 hodin. Po vysušení byly uzavřené baňky skladovány v chladničce při teplotě 2–8 °C, v případě extraktů v atmosféře argonu.

Extrakce kapalina-kapalina

Alkaloidní extrakt nebo jeho frakce byly rozpuštěny v příslušném množství 2% HCl a naředěny destilovanou vodou tak, aby byl získán roztok o pH ~ 2. Kyselý roztok byl zfiltrován přes vrstvu křemeliny Celite 535. Vrstva křemeliny byla před filtrací promyta destilovanou vodou. Zfiltrovaný kyselý roztok byl vytřepán 4 × Et₂O, a tímto způsobem byl zbaven lipofilních nečistot a některých pigmentů. Následně byl kyselý vodný roztok alkalizován 10% vodným roztokem Na₂CO₃ na pH 9-10 a vytřepán 4 × Et₂O, EtOAc, CHCl₃ nebo CHCl₃:EtOH (9:1). Organická složka byla zvolena podle polaritý obsažených látek. Kvantitativní extrakce alkaloidů byla průběžně kontrolována pomocí Mayerova činidla. Získaný výtřepok byl vysušen pomocí bezvodého Na₂SO₄.

Sloupcová chromatografie

Chromatografický sloupec byl připraven nalitím suspenze Al₂O₃ ve směsi rozpouštědel, která byla použita pro zahájení eluce. Sumární alkaloidní extrakt určený k dělení byl nanesen na sloupec ve formě trituratione, extrakt byl v poměru s adsorbentem 1:4 (w/w). Triturace byla připravena rozpuštěním extraktu v malém množství CH₂Cl₂ a MeOH, jeho adsorbováním na Al₂O₃ a následným vysoušením na vodní lázni do odpaření rozpouštědla. Vzniklá trituratione byla následně sušena v exsikátoru po dobu 24 hodin. Sloupcová chromatografie probíhala formou stupňovité eluce. Alkaloidy jednotlivých najímaných frakcí byly detekovány pomocí analytické TLC UV světlem při 254 nm a postříkem Dragendorffovým činidlem.

Příprava litých desek pro preparativní tenkovrstvou chromatografii

Preparativní TLC desky s litou vrstvou byly připravovány nalitím suspenze připravené rozmícháním 6,5 g komerčního silikagelu (Silikagel 60 GF₂₅₄) v 20,5 ml destilované vody na skleněné desky o rozměru 15 x 15 cm (29 mg SiO₂/cm²). Před použitím byly takto připravené desky sušeny při pokojové teplotě po dobu nejméně 24 hodin.

Preparativní tenkovrstvá chromatografie

Směs alkaloidů určená k separaci byla rozpuštěna ve směsi $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (1:1), $\text{EtOAc}:\text{MeOH}$ (1:1) nebo $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (1:1) a nanášena na chromatografickou desku pomocí chromatografického pera na linii startu (1,5 cm od spodní hrany desky) a 1 cm od okrajů desky. Množství desek pro preparativní TLC bylo počítáno pro každou preparativní tenkovrstvou chromatografii tak, aby množství dělené směsi nepřesahovalo 3 mg/cm u litých vrstev, 1 mg/cm u komerčních desek Merck (s vrstvou SiO_2) nebo 0,5 mg/cm u reverzních komerčních desek Merck. Desky byly ponechány volně na vzduchu do odpaření rozpouštědel z nanášené dělené směsi a poté byly vyvíjeny v chromatografických komorách. Komory se před použitím sytily zvolenou vyvíjecí směsí rozpouštědel po dobu 25 min. Desky byly po vyvinutí a vyjmutí z komory sušeny volně v digestoři, po vysušení analyzovány za využití UV detekce ($\lambda = 254$ a $\lambda = 366$ nm). Po UV detekci mohly být desky vyvíjeny znovu za použití stejné nebo odlišné mobilní fáze. Poté byly separované zóny označeny preparativní jehlou (využití UV detekce) a izolovány mechanickou separací z jednotlivých zón z chromatografické desky. Zóny s totožným R_f ze všech vyvíjených desek byly spojeny. Spojený separovaný adsorbent z jednotlivých zón byl smíchán s křemelinou Celite 535 a eluován v chromatografické trubici alespoň 15násobným množstvím směsi $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (1:1), $\text{EtOAc}:\text{MeOH}$ (1:1) nebo $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (1:1) podle toho, která ze směsí byla použita pro rozpuštění separované frakce.

Detekce alkaloidů po analytické tenkovrstvé chromatografii

Chromatogramy po všech TLC (frakce ze sloupcové chromatografie, kontrola čistoty izolovaných látek, hledání vhodných vyvíjecích směsí pro separaci) byly vždy nejprve detekovány vizuálně pomocí UV světla za použití dvou vlnových délek ($\lambda = 254$ nm a $\lambda = 366$ nm) a všechny viditelné zóny byly označeny tužkou. Chromatogramy s takto označenými zónami byly následně detekovány postříkem Dragendorffovým nebo tetrachloroplaticitým činidlem. Činidla byla použita k postříku suchých desek a v přítomnosti alkaloidů se na chromatografické desce objevily intenzivně oranžové skvrny v případě Dragendorffova činidla, skvrny fialové nebo hnědé barvy v případě hexachloroplaticitého činidla.

4.3.2 Metody použité pro strukturní identifikaci izolovaných alkaloidů

GC/MS analýza

Analýza složení jednotlivých frakcí a posléze i izolovaných alkaloidů byla provedena pomocí plynového chromatografu Agilent 7890A GC 5975 pracujícího s hmotnostním detektorem při

elektronové ionizaci 70 eV. Separace byla prováděna na koloně HP-5. Byl použit následující teplotní program: 100 °C–180 °C (15 °C/min), 180 °C (1 min), 180–300 °C (5 °C/min), 300 °C (15 min). Jako nosný plyn bylo použito helium, jehož průtoková rychlost byla 0,8 ml/min. Nástřik vzorku byl proveden při teplotě 280 °C. Byl nastříknut 1 µl methanolového roztoku analyzovaného vzorku (koncentrace 1 mg/ml) při splitu 1:10. Alkaloidy byly identifikovány porovnáváním jejich spekter se spektry dostupnými v komerční knihovně spekter NIST 17 (National Institute of Standards and Technology Library, USA), daty publikovanými v literatuře a se standardy látek, které byly v naší laboratoři již izolovány.

Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem

MS (ESI) spektra byla měřena pro látky neionizující pomocí elektronové ionizace. Spektra byla získána pomocí systému Waters Autopurification™ HPLC-MS (Milford, USA). Vzorky (0,2–0,3 mg) byly rozpuštěny v 1 ml metanolu čistoty LC-MS, vzorky byly analyzovány při laboratorní teplotě. Na separaci byla použita kolona s reverzní fází XSelect® CSH™ C18 OBD™ (100 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm) (Milford, USA). Jako mobilní fáze byly použity voda s 0,1% kyselinou mravenčí (rozpuštědlo A) a methanol s 0,1% kyselinou mravenčí (rozpuštědlo B). Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Eluční program s gradientem byl naprogramován následovně (v/v): 0 min 5% B, 5 min 100% B, 8,5 min 5% B, poté 1,5 minuty v počátečních podmínkách pro ekvilibraci. Optimální hodnoty parametrů ESI-MS byly: kapilární napětí (0,8 kV), teplota próby (600 °C); kuželové napětí (15 V). LC/MS hmotnostní spektra byla zaznamenána v rozmezí od 200–800 m/z. Pro detekci PDA byl rozsah detektoru nastaven od 190 do 700 nm. LC ESI-MS analýzy byly provedeny v pozitivním iontovém režimu. Eluce sloučenin nastává v pořadí od více polárních k méně polárním, s narůstající eluční silou mobilní fáze. V průběhu chromatografické analýzy zůstává koncentrace kyseliny mravenčí konstantní.

Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS-Q-TOF MS (ESI))

Tato metoda hmotnostní spektrometrie byla využívána v případě izolace nových látek, které nebyly dosud v literatuře popsány. Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometru s vysokým hmotnostním rozlišením Waters Synapt G2Si s ionizací elektrosprejem v kladném módu a kombinovaným analyzátozem kvadrupól s analyzátozem doby letu (TOF). Vzorky byly měřeny v roztoku acetonitrilu a bylo porovnáváno teoretické m/z s m/z experimentálně zjištěným.

Nukleární magnetická rezonance

NMR spektra byla měřena v roztocích CDCl_3 při teplotě 25 °C na spektrometru VNMR S500 pracujícím při 499,87 MHz pro jádra ^1H a 125,70 pro jádra ^{13}C . K ozařování a detekci signálu byla použita širokopásmová dvoukanálová gradientová sonda s regulací teploty (OneNMR). Chemické posuny byly měřeny jako hodnoty δ pars per milion (ppm) a byly nepřímo vztaženy k TMS jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla. Hodnoty chemického posunu pro CDCl_3 jsou u atomů ^1H $\delta = 7,26$ ppm a u atomů ^{13}C $\delta = 77,0$ ppm. Získaná data jsou uváděna v následujícím pořadí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita spekter ^1H NMR, multiplicita (s: singlet, d: dublet, dd: dublet dubletu, t: triplet, q: kvartet, m: multiplet) a interakční konstanta J (Hz). Dvoudimenzionální (2D) NMR experimenty (gCOSY, gHSQC, gHMBC, NOESY) byly měřeny standardními sekvencemi dodanými firmou Varian. Parametry měření byly stanoveny podle množství vzorku, jeho čistoty a molekulové hmotnosti.

gCOSY (gradient correlation spectroscopy): crosspeak se objevuje mezi protony, které mají přímé spojení proton-proton přes tři vazby, 3JHH.

gHSQC (gradient heteronuclear single quantum coherence): jedna osa představuje ^1H a druhá ^{13}C . Tato spektra představují korelace mezi H a C přes jednu vazbu.

gHMBC (gradient heteronuclear multiple bond coherence): technika, která pomáhá určit korelace C s H přes 3 vazby (případně i 2 nebo 4 vazby).

NOESY (nuclear overhauser effect spectroscopy): crosspeak se objevuje mezi protony od sebe vzdálenými do 6 Å a jeho intenzita klesá se zvyšující se vzdáleností protonů v prostoru.

Cirkulární dichroismus

Existuje několik jednotek měření cirkulárního dichroismu. V literatuře jsou uváděny molární elipticita, střední zbytková elipticita a delta epsilon. Elipticita alkaloidů byla měřena v jejich methanolových roztocích na CD spektropolarimetru Jasco J-815 a molární elipticita jednotlivých látek byla vypočítána podle vzorce:

$$[\Theta] = \frac{\Theta \times M}{c \times l \times 10}$$

Θ – elipticita odečtená z přístroje; M – molekulová hmotnost zkoušené látky; c – koncentrace zkoušeného roztoku (g/ml), l – tloušťka kvivety

Vzájemný vztah mezi molární elipticitou a molárním cirkulárním dichroismem udává následující vzorec:

$$[\Theta] = 2,303 \times \Delta\varepsilon \times \frac{4500}{\pi}$$

$[\Theta]$ – molární elipticita; $\Delta\varepsilon$ – molární cirkulární dichroismus

Měření optické otáčivosti

Optická otáčivost alkaloidů byla měřena v jejich methanolových nebo chloroformových roztocích na polarimetru P3000 a specifická otáčivost jednotlivých látek byla vypočítána podle vzorce:

$$[\alpha]_D^t = \frac{100 \times \alpha}{c \times l}$$

t – teplota měření [°C]; D – sodíková čára $\lambda = 589,3$ nm; α – naměřená otáčivost [°]; c – koncentrace zkoušené látky [g/100 ml]; l – délka kyvety [dm].

4.4 Studium biologické aktivity izolovaných alkaloidů

4.4.1 Stanovení inhibiční aktivity vůči humánním cholinesterázám

Příprava hemolyzátu a plazmy

Jako zdroj acetylcholinesterázy (*hAChE*) byl použit hemolyzát lidských erytrocytů. Zdrojem butyrylcholinesterázy (*hBuChE*) byla lidská plazma. Erytrocyty byly získány z čerstvě odebrané citrátované krve zdravých dobrovolníků (18 ml krve + 2 ml 3,4% roztoku citrátu). Bezprostředně po odběru byla krev stejnoměrně rozdělena po 5 ml do šroubovacích zkumavek a poté byla provedena centrifugace po dobu 10 minut při rychlosti 4000 rpm při 4 °C. Po první centrifugaci byla plazma odsáta tak, aby v ní nebyly erytrocyty, a byla uchována do stanovení aktivity *hBuChE* v chladničce při 4 °C (nejdéle však 6 hodin).

Zbytek plazmy z erytrocytárního sedimentu byl opatrně odsát bezpopelným filtračním papírem s hlazeným povrchem, jehož špička byla sestřižena. Byl odečten objem erytrocytární masy a tento sediment byl zředěn takovým množstvím 5 mM fosfátového pufru pH 7,4 obsahujícím 150 mM NaCl, aby byl objem suspenze 13 ml. Takto připravená suspenze byla dobře promíchána a poté byla provedena centrifugace stejným způsobem jako při oddělování plazmy (uvedeno výše). Promytí tímto způsobem bylo provedeno celkem 3x, promývací kapalina byla dokonale odstraněna. Po tomto promytí bylo přidáno takové množství 5 mM fosfátového pufru pH 7,4 bez obsahu chloridu sodného, aby byl objemový poměr erytrocyty : pufr 1 + 8 – 9, směs

se byla opět homogenizována, přelita do Erlenmeyerovy baňky a erythrocyty se byly ponechány spontánně hemolyzovat za míchání teflonovým míchadlem při 300 rpm. Ihned po skončení této řízené hemolýzy byla u suspenze stanovena acetylcholinesterázová aktivita, případně byla 5mM fosfátovým pufrům upravena absorbance (hodnota absorbance musí být 0,08–0,15) a naředěný hemolyzát byl uchováván do doby použití při -22 °C. Butyrylcholinesterázová aktivita plazmy byla stanovena stejným způsobem (přičemž hodnota absorbance byla v rozmezí 0,15–0,20), byla uchovávána stejným způsobem jako hemolyzát.

Vlastní stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů

Pro stanovení hodnoty IC₅₀ byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB)¹⁷⁸ [$\lambda = 436$ nm (AChE), nebo $\lambda = 412$ nm (BuChE)]. Byl sledován nárůst absorbance za 1 minutu. Hodnoty IC₅₀ byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterázy nebo butyrylcholinesterázy nelineární regrese v programu GraphPaD Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce GraphPaD Software, San Diego, CA, USA). Výsledky byly porovnány s hodnotami IC₅₀ známých inhibitorů cholinesteráz: galanthaminem a huperzinem A. Procenta inhibice (% I) byla počítána podle vzorce:

$$\% I = 100 - \left(100 \times \frac{\Delta A_{Bl}}{\Delta A_{Sa}} \right)$$

% I – procento inhibice; ΔA_{Bl} – pokles absorbance slepého vzorku během 1 min; ΔA_{Sa} – absorbance testovaného vzorku během 1 min.

Stanovení aktivity enzymů: do 6 jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 8,3 μ l plazmy nebo hemolyzátu, přidáno 283 μ l 5 mM DTNB a 8,3 μ l DMSO, vše bylo po dobu 1 min promícháváno na mikrotřepačce a poté byla směs inkubována v komoře readeru při 37 °C po dobu 5 minut. Po inkubaci bylo přidáno 33,3 μ l roztoku substrátu (10 mM ATChI nebo 10 mM BuTChI) a při příslušné vlnové délce (AChE-hemolyzát: 436 nm; BuChE-plazma: 412 nm) byla proměřena absorbance. Způsobem popsaným výše byl vypočten rozdíl a stanovena průměrná hodnota inhibice se směrodatnou odchylkou.

Stanovení aktivity látek: do mikrotitrační destičky byly použity stejné objemy činidel a roztoku substrátu (6 řad po 3 jamkách), shodný byl též postup měření. Pro měření inhibiční aktivity látky byly použity koncentrace: 40; 10; 4; 1 a 0,4 mM, případně další série koncentrací v tomto početním modu, pokud byla aktivita vysoká. Do poslední 6. řady byl pipetován DMSO jako slepý vzorek. Získané inhibiční aktivity IC₅₀ hAChE a IC₅₀ hBuChE pro jednotlivé látky byly

porovnávány s inhibičními aktivitami referenčních látek galanthaminem ($IC_{50, hAChE} = 1,710 \pm 0,065 \mu M$, $IC_{50, hBuChE} = 42,301 \pm 0,065 \mu M$), Huperzinem A ($IC_{50, hAChE} = 0,033 \pm 0,001 \mu M$, $IC_{50, hBuChE} > 1000 \mu M$) a berberinem ($IC_{50, hAChE} = 0,705 \pm 0,104 \mu M$, $IC_{50, hBuChE} = 30,721 \pm 3,492 \mu M$).

Kinetická studie inhibice hAChE a hBuChE

Kinetické studie byly provedeny ve spolupráci s Katedrou toxikologie a vojenské farmacie na Fakultě vojenského zdravotnictví Univerzity Obrany. Podrobný popis postupů je možno nalézt v následující publikaci Hošťálková et al. (2019)¹⁶⁴. Postup pro stanovení inhibičního mechanismu byl podobný jako pro stanovení hodnoty IC_{50} s tím rozdílem, že byly použity čtyři různé koncentrace ATChI a BuTChI.

4.4.2 In silico studie

Abychom určili kritické strukturální aspekty zodpovědné za vysokou inhibiční aktivitu izolovaných látek vůči hAChE a hBuChE byla provedena dockingová studie ve spolupráci s Katedrou toxikologie a vojenské farmacie na Fakultě vojenského zdravotnictví Univerzity Obrany. Podrobný popis studie je možno nalézt v následující publikaci Hošťálková et al. (2019)¹⁶⁴.

4.4.3 Stanovení inhibiční aktivity vůči prolyloligopeptidase

Studie týkající se inhibiční aktivity vůči POP byly provedeny ve spolupráci s Katedrou toxikologie a vojenské farmacie na Fakultě vojenského zdravotnictví Univerzity Obrany. Podrobný soupis studií a postupů je možno nalézt v následující publikaci Hošťálková et al. (2019)¹⁶⁴.

4.4.4 Predikce průchodu látek přes hematoencefalickou bariéru

Predikce průchodu látek přes hematoencefalickou bariéru (HEB) byla provedena prostřednictvím PAMPA-BBB testu (*in vitro* parallel artificial membrane permeability assay-blood brain barrier) ve spolupráci s Katedrou toxikologie a vojenské farmacie na Fakultě vojenského zdravotnictví Univerzity Obrany. Podrobný soupis studií a postupů je možno nalézt v následující publikaci Hošťálková et al. (2019)¹⁶⁴.

4.4.5 Stanovení cytotoxické aktivity *in vitro*

Studie týkající se cytotoxicity izolovaných látek byly provedeny ve spolupráci s Ústavem lékařské biochemie na Lékařské fakultě v Hradci Králové. Podrobný soupis studií a vysvětlení postupů je možno nalézt v následující publikaci Havelek et al. (2014)^{163, 165}. Ve spolupráci s LF HK bylo provedeno stanovení buněčné viability/cytotoxického působení testovaných látek pomocí kolorimetrické metody WST-1. Tato metoda je variací na metodu MTT, ale používá 4-[3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát místo roztoku 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu, který je používán při MTT testu. Obě tato činidla jsou tetrazoliové soli, ale u WST-1 odpadá krok rozpouštění a stanovení je rychlejší a citlivější^{166, 167}. Z testovaných látek byly v závislosti na jejich rozpustnosti připraveny zásobní roztoky o koncentraci 10–50 mM a dále byly ředěny v čas potřeby tak, aby koncentrace DMSO byla < 0,1%, aby byl vyloučen jeho toxický efekt.

4.5 Rostlinný materiál

Čerstvé cibule *Zephyranthes citrina* (*Z. citrina*) byly dodány firmou Lukon Glads (Sadská, Česká republika). Botanická verifikace rostlinného materiálu byla provedena prof. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc. Dokladný vzorek byl uložen v herbáriu Katedry farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové pod označením: CUFPH-16130/AL-212.

4.6 Izolace alkaloidů

Čerstvé cibule (35 kg) *Z. citrina* byly pokrájeny a rozemlety v mlýnku. Takto rozdrobněný rostlinný materiál byl 2 × extrahován dvojnásobným množstvím 95% EtOH za varu pod zpětným chladičem po dobu 30 minut. Spojené extrakty byly zfiltrvány a odpařeny za vzniku odparu ve formě hnědého sirupu. Takto připravený sumárního ethanolickeho extrakt byl postupně rozpuštěn v 7 litrech 5% HCl a naředěn destilovanou vodou na 10 l roztoku o pH ~ 2. Kyselý roztok byl zfiltrován přes vliselín a posléze přes vrstvu křemeliny Celite 535. Vrstva křemeliny byla před filtrací promyta destilovanou vodou. Kyselý vodný roztok byl alkalizován 10% vodným roztokem Na₂CO₃ na pH 9–10 a vytřepán 4 × 12 litry CHCl₃ za průběžné kontroly vodné fáze Mayerovým činidlem. Organická fáze byla odpařena za zisku 312 g sumárního alkaloidního extraktu konzistence hnědého sirupu. Tento primární alkaloidní extrakt byl dále přečišťován vytřepáváním. Odparek byl rozpuštěn v 5 litrech 2% HCl a výsledný roztok zfiltrován přes vrstvu křemeliny Celite 535, jež byla následně promyta 1 litru destilované vody.

Vodná fáze byla odtučněna 2 × 3 l Et₂O, alkalizována Na₂CO₃ na pH 9–10 a vytřepána 4 × 5 litry CHCl₃. Kvantitativní extrakce alkaloidů byla průběžně kontrolována pomocí Mayerova činidla. Chloroformový výtřepok byl vysušen pomocí bezvodého Na₂SO₄, bylo získáno 210 g alkaloidního výtřepku, který byl dále přečištěn. Alkaloidní výtřepok byl rozpuštěn ve 4 litrech 2% HCl a výsledný roztok zfiltrován přes vrstvu křemeliny Celite 535, která byla poté promyta 0,5 litry destilované vody. Vodná fáze byla opět odtučněna 2 × 2 litry Et₂O, následně alkalizována pomocí Na₂CO₃ na pH 9-10 a vytřepána 4 × 4 litry EtOAc a 2 × 4 litry CHCl₃. Kvantitativní extrakce alkaloidů byla opět průběžně kontrolována pomocí Mayerova činidla. Oba výtřepky byly vysušeny pomocí bezvodého Na₂SO₄ a na základě kontrolního TLC spojeny dohromady za zisku 151 g koncentrovaného alkaloidního extraktu, který byl dále podroben sloupcové chromatografii na neutrálním Al₂O₃ deaktivovaným 6 % destilované vody. V následujících tabulkách jsou uvedeny parametry a průběh sloupcové chromatografie (Tab. 9-11, Obr. 33-36).

Tabulka 9: Parametry sloupcové chromatografie alkaloidního extraktu *Z. citrina*

Hmotnost odparku	151 g
Adsorbent na trituraci	600 g
Adsorbent na náplň kolony	6000 g
Vrstva alkaloidní trituratione	15 cm
Objem frakce	500 ml

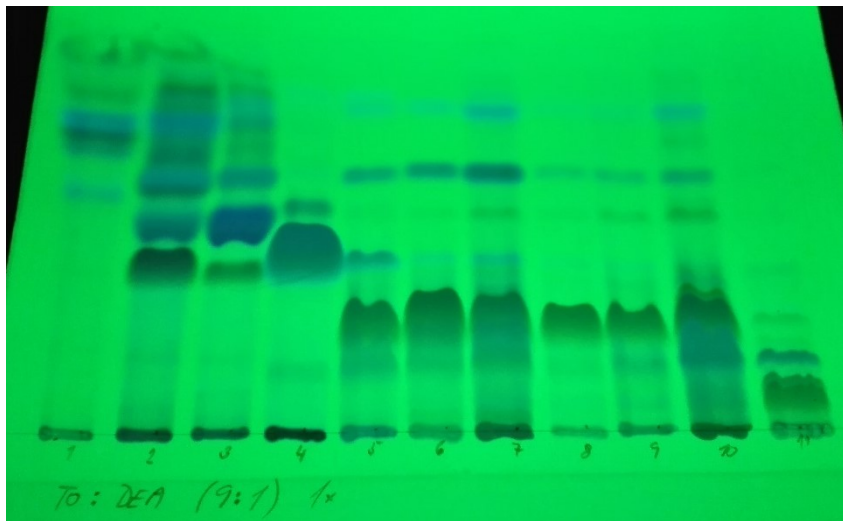
Tabulka 10: Mobilní fáze na TLC pro monitorování průběhu sloupcové chromatografie

Označení mobilní fáze	Složení mobilní fáze	Frakce
S12	To : DEA (98 : 2)	32–58
S13	To : DEA (90 : 10)	59–278
S16	To : EtOH : DEA (85 : 10 : 5)	279–490
S17	To : EtOH : DEA (70 : 30 : 5)	491–685

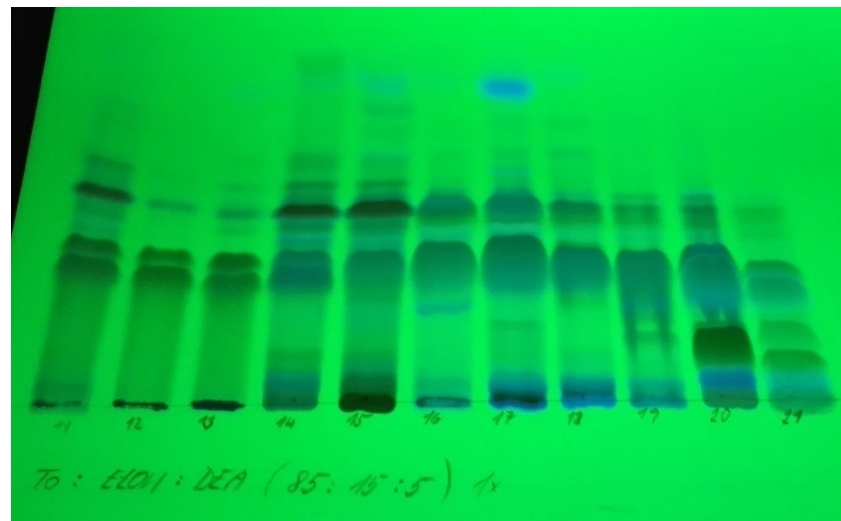
Tabulka 11: Průběh sloupcové chromatografie

Označení	Spojené frakce	Mobilní fáze	Množství	Popis	Poznámka
1	32-34	Bz : CHCl ₃ (34 : 66)	0,01 g	bez obsahu alkaloidů	-
2	35-42	Bz : CHCl ₃ (34 : 66)	0,11 g	viskózní, hnědý	Frakce 2 a 3 spojeny
3	43-58	Bz : CHCl ₃ (34 : 66)	0,22 g	viskózní, hnědý	
4	59-82	Bz : CHCl ₃ (34 : 66)	12,37 g	krystalizující, hnědý	-
5	83-97	Bz : CHCl ₃ (34 : 66)	4,84 g	krystalizující, nažloutlý	Frakce 5 a 6 spojeny
6	98-103	Bz : CHCl ₃ (34 : 66)	4,39 g	krystalizující, nažloutlý	
7	104-187	Bz : CHCl ₃ (34 : 66) Bz : CHCl ₃ (25 : 75)	8,43 g	krystalizující, nažloutlý	Frakce 7 a 8 spojeny
8	188-224	Bz : CHCl ₃ (25 : 75) Bz : CHCl ₃ (15 : 85)	4,65 g	krystalizující, nažloutlý	
9	225-261	Bz : CHCl ₃ (15 : 85)	1,79 g	krystalizující, nažloutlý	Frakce 9 a 10 spojeny
10	262-278	CHCl ₃ (100)	0,32 g	krystalizující, nahnědlý	
11	279-294	CHCl ₃ (100)	3,60 g	krystalizující, nahnědlý	-
12	295-328	CHCl ₃ (100)	7,05 g	krystalizující, bílý	Frakce 12, 13 a 14 spojeny
13	329-365	CHCl ₃ (100) CHCl ₃ : EtOH (99 : 1)	10,40 g	krystalizující, nažloutlý	
14	366-393	CHCl ₃ : EtOH (99 : 1) CHCl ₃ : EtOH (98 : 2)	2,68 g	krystalizující, nažloutlý	
15	394-430	CHCl ₃ : EtOH (98 : 2) CHCl ₃ : EtOH (95 : 5)	2,98 g	viskózní, hnědý	-
16	431-443	CHCl ₃ : EtOH (95 : 5)	1,30 g	krystalizující, hnědý	Frakce 17 a 18 spojeny
17	444-490	CHCl ₃ : EtOH (95 : 5) CHCl ₃ : EtOH (90 : 10)	9,51 g	krystalizující, nažloutlý	
18	491-516	CHCl ₃ : EtOH (90 : 10)	4,54 g	viskózní, hnědý	-
19	517-543	CHCl ₃ : EtOH (90 : 10) CHCl ₃ : EtOH (80 : 20)	5,97 g	krystalizující, hnědý	-
20	544-606	CHCl ₃ : EtOH (80 : 20) CHCl ₃ : EtOH (50 : 50)	7,31 g	krystalizující, nahnědlý	-
21	607-685	MeOH (100) MeOH : HCl (99,8 : 0,2)	3,57 g	viskózní, hnědý	-
Celkem			96,02 g		-

V posledním sloupci jsou okomentovány frakce, které byly vzhledem k velmi podobnému alkaloidnímu profilu spojeny a dále zpracovávány společně



Obrázek 33: Chromatogram spojených frakcí 1-11 (S13, vyvinuto 1x, detekce pod UV světlem při $\lambda = 254$ nm)



Obrázek 34: Chromatogram spojených frakcí 11-21 (S16, vyvinuto 1x, detekce pod UV světlem při $\lambda = 254$ nm)



Obrázek 35: Chromatogram spojených frakcí 1-11 (S13, vyvinuto 1x, detekce Dragendorffovým činidlem)



Obrázek 36: Chromatogram spojených frakcí 11-21 (S16, vyvinuto 1x, detekce Dragendorffovým činidlem)

4.6.1 Izolace látek ze spojených alkaloidních frakcí

Frakce 2–3 (330 mg) byla pomocí TLC na komerčních deskách (S3, 2×) rozdělena na 5 podfrakcí. Z podfrakce **ZC-F3/1** bylo získáno 110 mg látky **ZC-1**, jež byla pomocí GC-MS a standardu identifikována jako alkaloid lykorinového strukturního typu galanthin. Z podfrakce **ZC-F3/2** bylo po dočištění (S12, 2×) získáno 5 mg látky **ZC-2**, která byla pomocí GC/MS identifikována jako alkaloid krininového strukturního typu buphanisin. Z podfrakce **ZC-F3/3** bylo po dočištění (S1, 2×) získáno 11 mg alkaloidní látky **ZC-3**, která byla pomocí NMR identifikována jako alkaloid krininového strukturního typu 9-demethyl-6-ethoxyhippeastidin. Z podfrakce **ZC-F3/4** bylo po dočištění (S1, 1×) získáno 9,5 mg alkaloidní látky **ZC-4**, která byla pomocí NMR určena jako alkaloid krininového strukturního typu 10-deoxy-6 α -ethoxyhippeastidin. Podfrakce **ZC-F3/5** byla nealkaloidní povahy.

Z **frakce 4** (12,37 g) bylo krystalizací ze směsi CHCl₃:EtOH (1:1) získáno 3,41 g nažloutlých krystalů a 8,96 g matečného louhu frakce 4 (**ML-4**). Krystaly byly analyzovány pomocí TLC (S2, 2×) a GC/MS, jednalo se o alkaloid lykorinového strukturního typu **ZC-1**, minoritní složkou byl alkaloid homolykorinového strukturního typu **ZC-5**, který byl identifikován jako nerinin. Krystaly byly rekrystalizovány ze směsi CHCl₃:EtOH (1:1), byl získán čistý alkaloid **ZC-1** (3,12 g). Matečný louh (**ML-4/k**) byl odsát a dočištěn na litých deskách (S1, 2×), bylo získáno 40 mg **ZC-5**. **ML-4** (8,96 g) byl podroben extrakci kapalina-kapalina. Bylo získáno 5,02 g přečištěného **ML-4**, který byl podroben flash chromatografii.

Parametry flash chromatografie **ML-4**

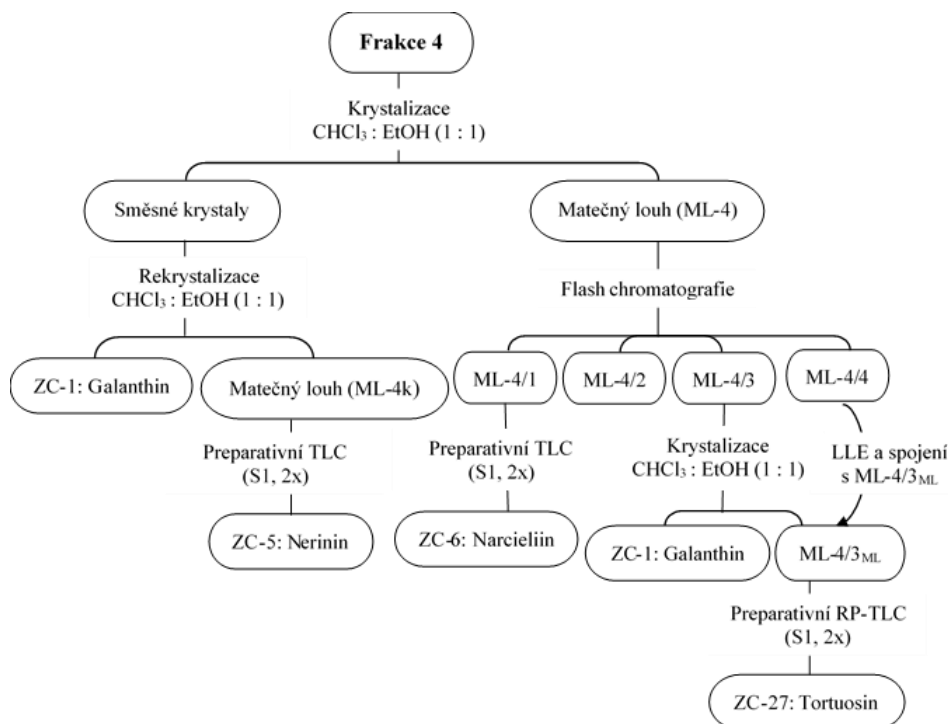
Vzorek (**ML-4**) o hmotnosti 5,02 g byl naadsorbován na oxid hlinitý, byla připravená trituratione o hmotnosti 20,08 g. Pro separaci byla použita kolona (36,1 × 211 mm) naplněná oxidem hlinitým (hmotnost adsorbentu 120 g, velikost částic 32–63 μ m). Před vlastní separací byla kolona kondicionována 20 min při průtoku 60 ml/min a složení mobilní fáze DCM + DEA (100 + 0,1). Jako mobilní fáze byly použity DCM + DEA (100 + 0,1 %) jako MF A, EtOAc : DEA (100 + 0,1 %) jako MF B a MeOH + DEA (100 + 0,1 %) jako MF C. Průtok mobilní fáze (MF) byl po celou dobu analýzy 60 ml/min, celková doba analýzy byla 90 min. V první části separace docházelo k mísení MF A a MF B. Eluční program s gradientem byl naprogramován následovně (v/v): 0–10 min (0 % MF B), 10–20 min (0–100 % MF B), 20–30 min (100 % MF B). Ve druhé fázi separace docházelo k mísení MF B a MF C. Eluční program s gradientem byl nastaven takto: 30–80 min (0–100 % MF C), 80–90 min (100 % MF C). Objem frakce činil 30 ml. Průběh chromatografie byl detekován UV zářením při čtyřech vlnových

délkách ($\lambda_1 = 220 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 254 \text{ nm}$, $\lambda_3 = 280 \text{ nm}$, $\lambda_4 = 350 \text{ nm}$) a pomocí kontrolní TLC (S9, 2×) a (S11, 2×).

Tabulka 12: Výsledek flash chromatografie ML-4

Označení	Spojené frakce	Množství	Popis
ML-4/1	1-67	102 mg	krystalizující, nažloutlý
ML-4/2	68-80	1,56 g	krystalizující, bílý
ML-4/3	81-83-24b	961 mg	krystalizující, nažloutlý
ML-4/4	25b-120b	238 mg	viskózní, hnědý

Na základě kontrolní TLC byly eluáty z flash chromatografie spojeny do 4 podfrakcí (Tab. 12). Podfrakce **ML-4/1** byla dočištěna na komerčních deskách (S9, 2×), bylo získáno 50 mg alkaloidu ve směsi 2 izomerů, který byl identifikován jako dimerní alkaloid narcikachninového strukturního typu **ZC-6** (narcieiin). Podfrakce **ML-4/2** obsahovala 1,56 g čistého **ZC-1**. Podfrakce **ML-4/4** byla podrobena extrakci kapalina-kapalina. Na základě kontrolního TLC bylo 123 mg přečištěné podfrakce **ML-4/4** připojeno k podfrakci **ML-4/3**. Z podfrakce **ML-4/3** bylo vykryštalizováno 800 mg **ZC-1** ze směsi $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (1:1). Matečný loup (261 mg) **ML-4/3_{ML}** byl přečištěn na komerčních deskách s RP-C18 a bylo získáno 5 mg kvartérního alkaloidu lykorinového typu **ZC-27**, tortuosinu. Pro snadnější orientaci v izolaci alkaloidů z frakce 4 je uveden následující obrázek (Obr. 37).



Obrázek 37: Schéma izolace alkaloidů z frakce 4

Z **frakce 5–6** (9,23 g) bylo krystalizací ze směsi $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (1:1) získáno 5,25 g alkaloidu haemanthaminového strukturního typu **ZC-7** (haemanthamin). Matečný louh (3,98 g) byl zbaven nealkaloidních nečistot extrakcí kapalina-kapalina. Bylo získáno 3,23 g ethylacetátového (**ZC-F5-6E**) a 300 mg chloroformového výtřepku (**ZC-F5-6C**). Chloroformový výtřepok **ZC-F5-6C** byl separován na litých deskách (S19, 1x). Byly získány 2 podfrakce **ZC-F5-6C/1** a **ZC-F5-6C/3**, které byly dočištěny na komerčních deskách (S29, 1x) a (S28,1). Byly izolovány 2 dosud nepopsané alkaloidy, které na základě NMR náleží ke krininovému nebo k haemanthaminovému strukturnímu typu. Z podfrakce **ZC-F5-6C/1** bylo izolováno 40 mg alkaloidu **ZC-8** (zephyjanin) a z frakce **ZC-F5-6C/3** 30 mg alkaloidu **ZC-9** (zephycitrin I). Z ethylacetátového výtřepku **ZC-F5-6E** bylo ze směsi $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (1:1) vykrystalizováno 1,72 g alkaloidu **ZC-7**. Matečný louh **ZC-F5-6E** (1,57 g) byl rozdělen na litých deskách (S19, 1x), separací byl matečný louh frakcionován na 4 alkaloidní podfrakce. Podfrakce **ZC-F5-6E/A** (63 mg) byla dočištěna pomocí TLC (S8, 1x), bylo izolováno dalších 20 mg látky **ZC-8**. Podfrakce **ZC-F5-6E/B** (346 mg) byla dále separována pomocí TLC na litých deskách (S26, 2x), bylo získáno dodatečných 233 mg **ZC-7** a 20 mg **ZC-9**. Podfrakce **ZC-F5-6E/D** (172 mg) byla dočištěna na litých deskách (S15, 2x), byl izolován alkaloid **ZC-1**. Podfrakce **ZC-F5-6E/E** (115 mg) byla přečištěna na litých deskách (S26, 1x) za zisku 58 mg alkaloidu tazettinového strukturního typu **ZC-10** (tazettin).

Z **frakce 7–8** (13,08 g) bylo ze směsi $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (1:1) vykrystalizováno dalších 12,19 g alkaloidu **ZC-7**. Matečný louh **ML-7-8** (894 g) byl dočištěn na litých deskách (S27, 2x). Bylo izolováno 503mg **ZC-7** a podfrakce **ML-7-8/2** (60 mg). Podfrakce **ML-7-8/2** byla dočištěna na komerčních deskách (S22, 1x), bylo získáno dodatečných 23 mg látky **ZC-9**.

Frakce 9–10 (4,52 g) byla kvůli velkému množství nealkaloidních nečistot podrobena přečištění extrakcí kapalina-kapalina a bylo získáno 1,5 g ethylacetátového výtřepku **ZC-F9-10**. Ten byl dále rozdělen pomocí preparativní TLC (S28, 1x) na tři podfrakce, majoritu opět tvořil alkaloid **ZC-7**. Podfrakce **ZC-F9-10/2** (48 mg) byla přečištěna pomocí TLC na komerčních deskách (S20, 1x), bylo získáno 14 mg **ZC-9**. Podfrakci **ZC-F9-10/3** (1,32 g) nebylo nutné dále přečišťovat, jednalo se o čistý **ZC-7**. Podfrakce **ZC-F9-10/4** (57 mg) byla přečištěna pomocí preparativní TLC na komerčních deskách (S18, 1x), bylo izolováno dalších 23 mg alkaloidu **ZC-10**.

Frakce 11 (3,60 g) na základě analytické TLC (S20, 2x) a GC/MS zjištěno, že se jedná o směs dvou alkaloidů, které byly separovány na litých deskách (S28, 3x). Bylo izolováno 1,95 g podfrakce **ZC-F11/1**, která byla dočištěna na litých deskách (S20, 2x). Bylo získáno 1,4 g

alkaloidu haemanthaminového strukturního typu **ZC-11** (maritidin). Podfrakce **ZC-F11/2** (955 mg) byla dočištěna za použití preparativní TLC na litých deskách (S8, 2×), bylo izolováno 658 mg alkaloidu haemanthaminového typu **ZC-12** (vittatin).

Frakce 12–13–14 (20,13 g) byly na základě shodného alkaloidního profilu spojeny. Frakce byly analyzovány pomocí TLC (S20, 3× a S28, 3×), GC/MS a HPLC/MS. Analýza prokázala přítomnost alkaloidů **ZC-11** a **ZC-12**. Na základě těchto analýz byly frakce uloženy jako zdroj alkaloidů pro přípravu polosyntetických derivátů.

Frakce 15 (2,98 g) byla vzhledem k přítomnosti značného množství nealkaloidních nečistot přečištěna přetřepáváním, bylo získáno 1,32 g ethylacetátového výtřepku **ZC-F15E** a 516 mg chloroformového výtřepku **ZC-F15c**. Chloroformový výtřepok **ZC-F15c** byl podroben preparativní TLC na litých deskách (S27, 3×) a bylo získáno 114 mg **ZC-F15c/1**. Tato látka byla identifikována jako alkaloid lykorinového strukturního typu **ZC-13** (narcissidin). Dále bylo izolováno 16 mg **ZC-F15c/2**, jednalo se o alkaloid lykorinového strukturního typu **ZC-14** (methylpseudolykorin). Ethylacetátový výtřepok **ZC-F15E** byl frakcionován pomocí preparativní TLC na litých deskách (S28, 2×), separací byly izolovány čtyři podfrakce. Podfrakce **ZC-F15E/1** (39 mg) byla dočištěna TLC na komerčních deskách (S29, 2×), bylo izolováno 10 mg alkaloidu haemanthaminového typu **ZC-15** (dihydromaritidin). Podfrakce **ZC-F15E/2** (119 mg) byla přečištěna za použití TLC na litých deskách (S28, 2×), bylo získáno 59 mg alkaloidu **ZC-11**. Podfrakce **ZC-F15E/3** (540 mg) byla dále separována TLC na litých vrstvách (S4, 2×), byly izolovány dvě látky. Podfrakce **ZC-F15E/3A** (279 mg) byla rekrystalizována z EtOAc, byly získány bílé krystaly alkaloidu **ZC-13** (210 mg). Látka **ZC-F15E/3B** (32 mg) byla dočištěna za použití TLC na komerčních deskách, bylo izolováno 15 mg alkaloidu homolykorinového strukturního typu **ZC-16** (7-ethoxy-10-methoxy-1-methyllykorenan-9-ol). Podfrakce **ZC-F15E/4** (30 mg) byla dočištěna za použití TLC na komerčních deskách (S29, 2×), bylo izolováno 18 mg alkaloidu lykorinového typu, který byl identifikován jako **ZC-17** (1-*O*-acetylkarantin).

Z **frakce 16–17** (10,81 g) bylo ze směsi CHCl₃:EtOH (9:1) vykrytalizováno 2,1 g alkaloidu haemanthaminového strukturního typu **ZC-18**, haemanthidinu. Matečný louh (8,71 g) byl dále předrozdělen vytřepáváním, bylo získáno 6,1 g ethylacetátového a 1,43 g chloroformového výtřepku. Chloroformový výtřepok byl za horka rozpuštěn v EtOAc, ochlazením roztoku bylo vykrytalizováno 940 mg alkaloidu **ZC-13**, narcissidin. Matečný louh byl připojen k ethylacetátovému výtřepku (6,59 g). Ethylacetátový výtřepok označený jako **ZC-F17** byl podroben flash chromatografii na reverzní fázi (Tab. 13). Chromatografická kolona RP

C18/120 g byla při první flash chromatografii záměrně přetížena, cílem bylo oddělení alkaloidu **ZC-13**, který v **ZC-F17** převažoval.

Parametry flash chromatografie ZC-F17

Vzorek (ZC-F17) o hmotnosti 6,59 g byl naadsorbován na reverzní fázi (octadecyl-functionalized silica gel), bylo připraveno 33 g trituratione. Pro separaci byla použita kolona FlashPure EcoFlex C18 120 g (sférické částice o velikosti 40–60 μm). Před vlastní separací byla kolona kondicionována 20 min při průtoku 40 ml/min a složení mobilní fáze (MF) 5 % MF B. Jako mobilní fáze byly použity $\text{H}_2\text{O} + \text{HCOOH}$ (100 + 0,1 %) jako MF A, $\text{MeOH} + \text{HCOOH}$ (100 + 0,1 %) jako MF B. Průtok mobilní fáze byl po celou dobu analýzy 40 ml/min, celková doba analýzy byla 90 min. Eluční program s gradientem byl naprogramován následovně (v/v): 0–10 min (5 % MF B), 10–80 min (5–100 % MF B), 80–90 min (100 % MF B). Objem jímaných frakcí činil 25 ml. Průběh chromatografie byl detekován UV zářením při čtyřech vlnových délkách ($\lambda_1 = 220 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 254 \text{ nm}$, $\lambda_3 = 280 \text{ nm}$, $\lambda_4 = 366 \text{ nm}$) a pomocí kontrolní TLC (S10, 2 \times) a (S28, 1 \times).

Tabulka 13: Výsledek flash chromatografie ZC-F17

Označení	Spojené frakce	Množství	Popis
ZC-F17/1	5-30	2,53 g	krystalizující, bílá
ZC-F17/2	31-70	2,1 g	krystalizující, nažloutlá

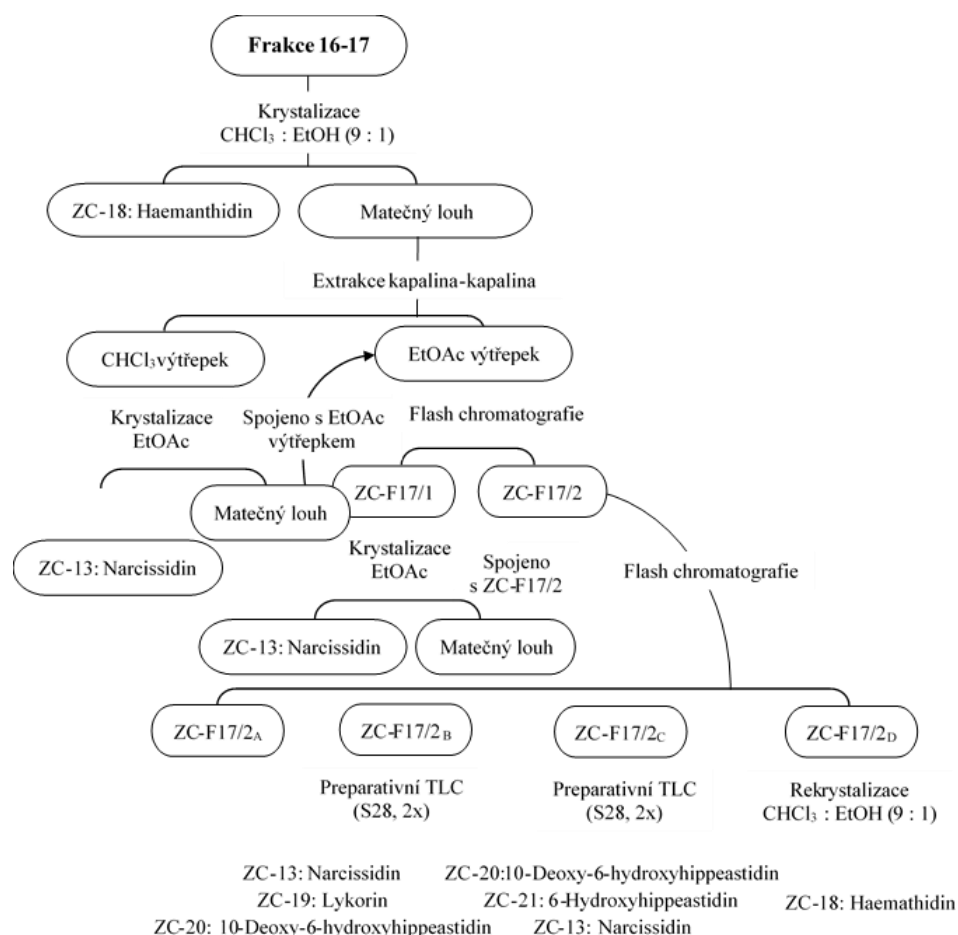
Podfrakce **ZC-F17/1** byla za horka rozpuštěna v EtOAc, následně prudce ochlazena, bylo vykrystalizováno 1,2 g **ZC-13**. Matečný louh byl připojen k podfrakci **ZC-F17/2** a bylo získáno 3,43 g směsi, která byla podrobena druhé flash chromatografii za shodných podmínek jako **ZC-F17** (Tab. 14).

Tabulka 14: Výsledek flash chromatografie ZC-F17/2

Označení	Spojené frakce	Množství	Popis
ZC-F17/2A	34-36	562 mg	krystalizující, bílá
ZC-F17/2B	37-43	224 mg	krystalizující, bílá
ZC-F17/2C	44-50	310 mg	krystalizující, bílá
ZC-F17/2D	51-60	1,3 g	krystalizující, bílá

Podfrakce **ZC-F17/2A** nebyla dále zpracována, byla uložena jako zdroj **ZC-13**. Podfrakce **ZC-F17/2B** byla rozdělena pomocí preparativní TLC na litých deskách (S28, 2 \times). Bylo izolováno 102 mg **ZC-F17/2B₁**, jednalo se o alkaloid **ZC-13**. Dále bylo získáno 19 mg **ZC-F17/2B₂**, podfrakci bylo nutno přečistit za použití TLC na komerčních deskách (S10, 2 \times),

bylo izolováno 9 mg alkaloidu lykorinového strukturního typu, který byl pomocí GC/MS identifikován jako **ZC-19** (lykorin). V podfrakci **ZC-F17/2B₃** byl identifikován alkaloid krininového typu ve směsi 2 izomerů (v poměru 7:3 α - a β - izomer) **ZC-20** (10-deoxy-6-hydroxyhippeastidin). Směs alkaloidů v podfrakci **ZC-F17/2C** byla dále rozdělena za použití TLC na litých deskách (S28, 2 \times). Byly izolovány tři alkaloidy, **ZC-F17/2C₁** byl identifikován jako alkaloid **ZC-13** (98 mg), z podfrakce **ZC-F17/2C₂** byl získán alkaloid **ZC-20** (75 mg). Podfrakce **ZC-F17/2C₃** (83 mg) byla dočištěna pomocí TLC na komerčních deskách (S21, 2 \times), bylo izolováno 59 mg alkaloidu krininového strukturního typu ve směsi dvou izomerů (v poměru 7:3 α - a β - izomer) **ZC-21** (6-hydroxyhippeastidinu). Podfrakce **ZC-F17/2D** byla rekrystalizována ze směsi CHCl_3 :EtOH (9:1), bylo získáno 980 mg **ZC-18**. Zpracování této frakce je přehledně shrnuto na následujícím obrázku (Obr. 38).



Obrázek 38: Schéma izolace alkaloidů z frakce 16-17

Z **frakce 18** (4,54 g) bylo ze směsi CHCl_3 :EtOH (7:3) vykrytalizováno 2,30 g **ZC-18**. Matečný lough (2,24 g) **ML-F18** byl následně podroben preparativní TLC na litých deskách (S27, 2 \times). Byly získány čtyři podfrakce. Podfrakce **ML-F18/1** (118 mg) byla dočištěna TLC na komerčních deskách (S23, 2 \times), bylo izolováno 79 mg alkaloidu **ZC-13**. Z podfrakce **ML-F18/2**

(122 mg) bylo pomocí TLC na litých deskách (S19, 2×) izolováno 50 mg **ZC-20**. Dočištěním podfrakce **ZC-F18/3** (163 mg) na litých deskách (S20, 1×) bylo získáno 71 mg **ZC-21**. Podfrakce **ZC-F18/4** byla tvořena čistým **ZC-18** (737 mg).

Frakce 19 (5,97 g), která byla tvořena převážně alkaloidem **ZC-18**. Vzhledem ke značnému množství nealkaloidních nečistot byla frakce přečištěna vytřepáváním. Bylo získáno 4,41 g ethylacetátového odparku. Ze směsi CHCl₃:EtOH (7:3) bylo vykrystalizováno 3,4 g alkaloidu **ZC-18**.

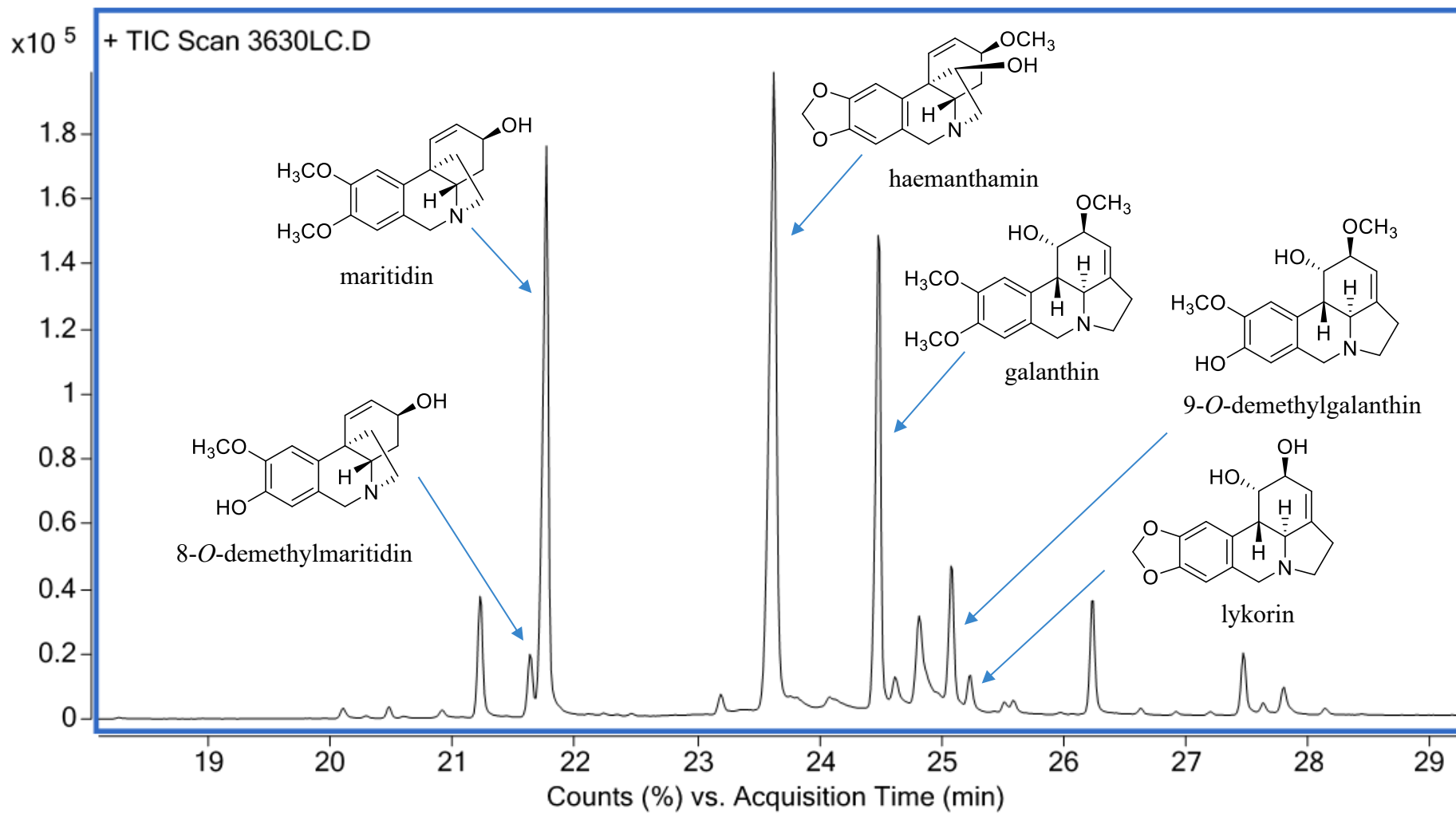
Frakce 20 (7,31 g) byla podrobena extrakci kapalina-kapalina. Extrakcí bylo získáno 5,49 g alkaloidního výtřepku, ze kterého bylo ze směsi CHCl₃:EtOH (9:1) vykrystalizováno 1,78 g alkaloidu **ZC-18**. Matečný louh frakce **ZC-F20** (3,71 g) byl podroben preparativní TLC na litých deskách (S28, 2×) a byly získány čtyři podfrakce. Z podfrakce **ZC-F20/1** (1,27 g) bylo dočištěním pomocí TLC na litých deskách (S30, 1×) izolováno 902 mg alkaloidu haemanthaminového typu **ZC-22** (8-*O*-demethylmaritidin). Podfrakce **ZC-F20/2** (61 mg) byla dočištěna preparativní TLC na komerčních deskách (S25, 1×), pomocí GC/MS byla látka identifikována jako alkaloid galanthaminového typu **ZC-23** (lykoramin). Z podfrakce **ZC-F20/3** (940 mg) bylo rekrystalizací z EtOAc získáno 730 mg alkaloidu lykorinového strukturního typu **ZC-24** (9-*O*-demethylgalanthin). Podfrakce **ZC-F20/4** (285 mg) byla tvořena čistým **ZC-18**.

Frakce 21 (3,57 g) byla separována pomocí preparativní TLC na litých deskách (S17, 2×) a byly izolovány čtyři podfrakce. Z podfrakce **ZC-F21/1** (270 mg) bylo rekrystalizací z EtOAc získáno 234 mg alkaloidu **ZC-22**. Podfrakce **ZC-F21/2** (1,4 g) pak byla rozdělena za použití preparativní TLC (S15, 2×), bylo izolováno 860 mg podfrakce **ZC-F21/2A**, která byla prostřednictvím NMR identifikována jako nový alkaloid haemanthaminového typu ve směsi dvou izomerů (v poměru 1:1 α- a β- izomer) **ZC-25** (zephycitrin II). Dále bylo získáno 8 mg **ZC-F21/2B**, látka byla identifikována jako alkaloid homolykorinového strukturního typu **ZC-26** (9-*O*-demethylhomolykorin). Podfrakce **ZC-F21/3** (150 mg) byla separována pomocí TLC na komerčních deskách (S33, 1×), byly izolovány dvě alkaloidní zóny **ZC-F21/3A** (20 mg) a **ZC-F21/3B** (15 mg). Zóna **ZC-F21/3B** byla tvořena alkaloidem **ZC-20** a zónu **ZC-F21/3A** bylo nutno přečistit pomocí TLC na komerčních deskách (S31, 1×), bylo izolováno 10 mg **ZC-21**. Podfrakce **ZC-F21/4** (1,2 g) byla separována preparativní TLC na litých deskách (S28, 2×), bylo získáno 215 mg **ZC-F21/4A**, identifikován jako alkaloid **ZC-24**, a 529 mg **ZC-F21/4B**, který byl identifikován jako alkaloid **ZC-18**.

5 VÝSLEDKY

5.1 GC/MS analýza alkaloidního extraktu *Zephyranthes citrina*

Cibule rostliny *Z. citrina* byly pro detailní fytochemickou studii vybrány na základě podrobné literární rešerše a screeningové studie biologických aktivit, jež byla provedena za využití alkaloidního extraktu, který byl získán z 200 g čerstvých cibulí *Z. citrina*. Připravený alkaloidní extrakt byl analyzován za využití GC/MS (Obr. 39). Byly predikovány tři alkaloidy lykorinového strukturního typu a tři alkaloidy haemanthaminového strukturního typu. Vzhledem k tomu, že se nepodařilo identifikovat poměrně široké spektrum alkaloidů, byl zde předpoklad, že by se mohlo jednat o nové, doposud nepopsané látky.



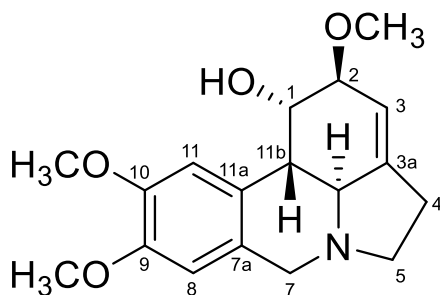
Obrázek 39: Chromatogram z GC/MS analýzy

5.2 Alkaloidy izolované ze *Zephyranthes citrina* a jejich strukturní analýza

5.2.1 ZC-1: Galanthin

Sumární vzorec: C₁₈H₂₃NO₄

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid lykorinového typu galanthin¹⁶⁸⁻¹⁷⁰.



Molekulová hmotnost

Mr = 317,39

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 289 (M⁺, 64), 288 (100), 274 (19), 232 (19), 202 (22), 115 (38).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

6.57 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-8), 6.51 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-7), 4.8 (1H, m, H-1), 3.98 (1H, m, H-3), 3.92 (1H, d, J = 15 Hz, H-6a), 3.76 (3H, s, OCH₃), 3.54 (1H, d, J = 15 Hz, H-6), 3.12 (1H, t, H-12), 2.96 (1H, t, H-12), 2.4 (1H, d, J = 16 Hz, H-2), 2.29 (3H, s, NCH₃), 1.4 – 1.9 (1H, m, H-2), 1.4 – 1.9 (2H, m, H-4), 1.4 – 1.9 (2H, m, H-4a), 1.4 – 1.9 (2H, m, H-11).

¹³C NMR (125 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

147.8 (C9), 147.7 (C8), 144.0 (C4), 129.5 (C6a), 126.1 (C10), 115.2 (C3), 110.8 (C7), 107.4 (C10), 80.8 (C2), 68.7 (C1), 61.1 (C4a), 57.6 (2 OCH₃), 56.7 (C6), 56.0 (9 OCH₃), 55.9 (8 OCH₃), 53.9 (C12), 41.7 (C10b), 28.6 (C11)

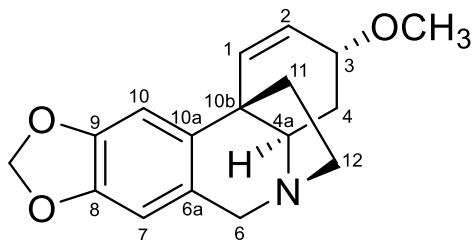
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = + 67^\circ$ (c = 0,269; CHCl₃)

5.2.2 ZC-2: Buphanisin

Sumární vzorec: C₁₇H₁₉NO₃

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid krininového typu buphanisin¹⁷¹.



Molekulová hmotnost

Mr = 285,34

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 285(100), 270(23), 253(25), 230(28), 215(80), 201(22), 187(20), 157(15)

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

6.86 (1H, s, H-10), 6.57 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-1), 6.51 (1H, s, H-7), 6.03 (1H, dd, J = 10.0, 5.2 Hz, H-2), 5.92-5.90 (2H, m, OCH₂O), 4.52 (1H, d, J = 16.8 Hz, H-6), 3.90 (1H, d, J = 16.8 Hz, H-6), 3.86-3.83 (1H, m, H-3), 3.56 (1H, brd, J = 13.0 Hz, H-12), 3.50 (1H, dd, J = 13.5, 3.6 Hz, H-4a), 3.37 (3H, s, C3-OCH₃), 3.02 (1H, ddd, J = 13.0, 9.0, 6.0 Hz, H-12), 2.33 (1H, brd, J = 13.5 Hz, H-4), 2.23 (1H, ddd, J = 12.3, 9.0, 4.0 Hz, H-11), 2.01 (1H, ddd, J = 12.3, 10.8, 6.0 Hz, H-11), 1.64 (1H, ddd, J = 13.5, 12.5, 3.9 Hz, H-4)

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

146.5 (C9), 146.1 (C8), 137.5 (C10a), 131.9 (C1), 125.8 (C2), 124.3 (C6a), 107.0 (C7), 103.1 (C10), 101.0 (OCH₂O), 72.2 (C3), 63.4 (C4a), 61.6 (C6), 56.7 (3 OCH₃), 53.2 (C12), 44.6 (C10b), 43.4 (C11), 29.0 (C4)

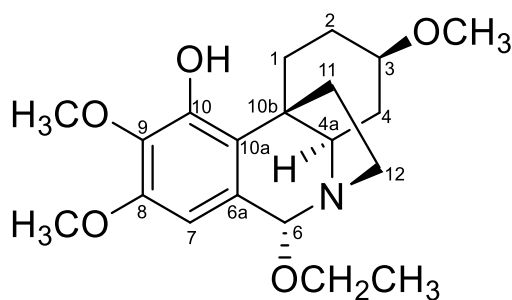
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{23} = -31^\circ$ (c=1; CHCl₃)

5.2.3 ZC-3: 6 α -Ethoxyhippeastidin

Sumární vzorec: C₁₉H₂₇NO₅

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) identifikována jako alkaloid krininového typu 6 α -ethoxyhippeastidin. V případě této látky se jedná o novou strukturu, konkrétně o ethoxy- derivát již dříve popsaného alkaloidu 6 α -hydroxyhippeastidinu. Absolutní konfigurace tohoto alkaloidu byla zjištěna na základě NMR experimentů, podrobnosti lze nalézt v disertační práci Mgr. Jany Maříkové, Ph.D.¹⁷².



Molekulová hmotnost

Mr = 349,42

MS analýza

HRMS (TOF-ESI⁺): *m/z* vypočteno pro C₁₉H₂₇NO₅⁺ [M+H]⁺ 350,2045, nalezeno 350,2067 [M+H]⁺

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

6.38 (1H, s, H7), 6.06 (1H, bs, Ar-OH), 4.54 (1H, s, H6), 4.08 (1H, dq, *J* = 9.5 Hz, *J* = 7.1 Hz, C6-OCH₂-), 3.86 (3H, s, 9-OCH₃), 3.85 (3H, s, 8-OCH₃), 3.68 (1H, dq, *J* = 9.5 Hz, *J* = 7.1 Hz, 6-OCH₂-), 3.39 (3H, s, 3-OCH₃), 3.33 (1H, ddd, *J* = 13.2 Hz, *J* = 9.9 Hz, *J* = 3.4 Hz, H12), 3.24–3.10 (2H, m, H3, H4a), 2.71–2.56 (1H, m, H12), 2.24–2.15 (1H, m, H11), 2.08–1.98 (2H, m, H2, H4), 1.80–1.68 (2H, m, H1, H11), 1.55–1.38 (1H, m, H2), 1.30 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, 6 OCH₂CH₃), 1.29–1.17 (1H, m, H4)

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

150.3 (C8), 146.3 (C10), 135.2 (C9), 129.9 (C6a), 126.3 (C10a), 103.9 (C7), 95.0 (C6), 77.7 (C3), 63.7 (6 OCH₂), 61.1 (C4a), 60.9 (9 OCH₃), 55.6 (3 OCH₃, 8 OCH₃), 47.4 (C12), 43.0 (C10b), 33.4 (C4), 33.1 (C11), 27.7 (C2), 26.4 (C1), 15.6 (6 OCH₂CH₃).

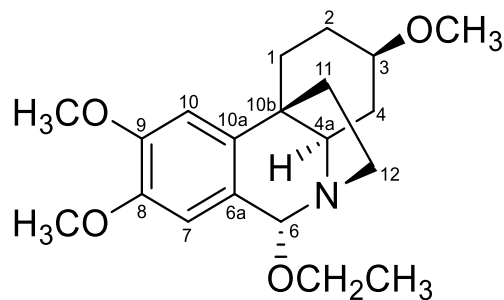
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{23} = +31,2^\circ$ (c=0,45; CHCl₃)

5.2.4 ZC-4: 10-Deoxy-6 α -ethoxyhippeastidin

Sumární vzorec: C₂₀H₂₉NO₄

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) identifikována jako nový alkaloid krininového typu 10-deoxy-6 α -ethoxyhippeastidin. Konkrétně se jedná o ethoxy-derivát již dříve popsaného alkaloidu 10-deoxy-6 α -hydroxyhippeastidinu. Podrobnosti o určení absolutní konfigurace tohoto alkaloidu lze nalézt v disertační práci Mgr. Jany Maříkové, Ph.D.¹⁷².



Molekulová hmotnost

Mr = 347,45

MS analýza

HRMS (TOF-ESI⁺): *m/z* vypočteno pro C₂₀H₃₀NO₄⁺ [M+H]⁺ 348,2170, nalezeno 348,2177 [M+H]⁺

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

6.74 (1H, s, H7), 6.66 (1H, s, H10), 4.61 (1H, s, H6), 4.07 (1H, dq, *J* = 9.7 Hz, *J* = 7.1 Hz, 6 OCH₂-), 3.87 (3H, s, 8-OCH₃), 3.86 (3H, s, 9-OCH₃), 3.70 (1H, dq, *J* = 9.7 Hz, *J* = 7.1 Hz, 6 OCH₂-), 3.40 (3H, s, 3 OCH₃), 3.32 (1H, ddd, *J* = 13.6 Hz, *J* = 10.1 Hz, *J* = 3.9 Hz, H12), 3.22–3.12 (2H, m, H3, H4a), 2.66 (1H, ddd, *J* = 13.6 Hz, *J* = 9.1 Hz, *J* = 6.0 Hz, H12), 2.46 (1H, dt, *J* = 13.6 Hz, *J* = 3.6 Hz, H1), 2.17 (1H, ddd, *J* = 12.2 Hz, *J* = 10.1 Hz, *J* = 6.0 Hz, H11), 2.13–2.06 (1H, m, H2), 1.71 (1H, td, *J* = 13.7 Hz, *J* = 4.4 Hz, H1), 1.66–1.54 (1H, m, H11), 1.54–1.44 (2H, m, H2, H4), 1.29 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, C6 OCH₂CH₃), 1.29–1.17 (1H, m, H4)

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C): 148.9 (C9), 147.6 (C8), 140.9 (C10a), 125.2 (C6a), 111.5 (C7), 105.5 (C10), 94.9 (C6), 77.9 (C3), 63.7 (6 OCH₂), 60.1 (C4a), 56.0 (9 OCH₃), 55.9 (8 OCH₃), 55.8 (3 OCH₃), 47.1 (C12), 42.0 (C10b), 34.6 (C11), 32.9 (C4), 27.4 (C2), 26.2 (C1), 15.6 (6 OCH₂CH₃)

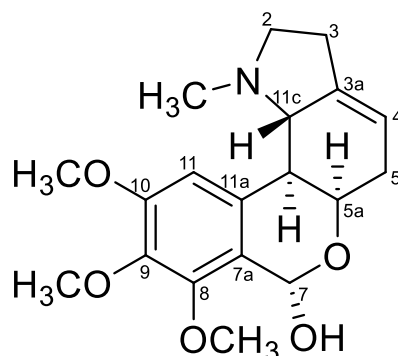
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{23} = +49,2$ (0,415; CHCl₃)

5.2.5 ZC-5: Nerinine

Sumární vzorec: C₁₉H₂₅NO₅

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání dat s literaturou identifikována jako alkaloid homolykorinového typu nerinine¹⁷³.



Molekulová hmotnost

Mr = 347,41

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 347(M⁺, <1) 222(1), 207(2), 179(1), 164(1), 110(8), 109(100), 108(18), 94(2)

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

6.77 (1H, s, H-11), 6.14 (1H, s, H-7 β), 5.47 (1H, br m, H-4), 4.52 (1H, ddd, J = 5.6, 2.0, 1.0 Hz, H-5 α), 3.99 (3H, s, 8-OCH₃), 3.87 (3H, s, 9-OCH₃), 3.86 (3H, s, 10-OCH₃), 3.14 (1H, m, H-2 α), 2.73 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-11c), 2.65 (1H, ddt, J = 19.2, 6.0, 2.8 Hz, H-5 α), 2.44-2.51 (1H, br m, H-3), 2.41 (1H, dd, J = 9.6, 1.5 Hz, H-11b), 2.34 (1H, dt, J = 19.2, 2.5 Hz, H-5 β), 2.24 (1H, q, J = 9.2 Hz, H-2 β)

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

153.1 (C10), 151.3 (C8), 141.2 (C9), 141.1 (C3 α), 133.6 (C11 α), 121.2 (C7 α), 115.8 (C4), 109.1 (C11), 89.8 (C7), 67.5 (C11c), 66.3 (C5 α), 61.4 (C8), 61.0 (9 OCH₃), 57.1 (C2), 56.3 (10 OCH₃), 44.6 (NCH₃), 44.5 (C11b), 31.9 (C5), 28.4 (C3)

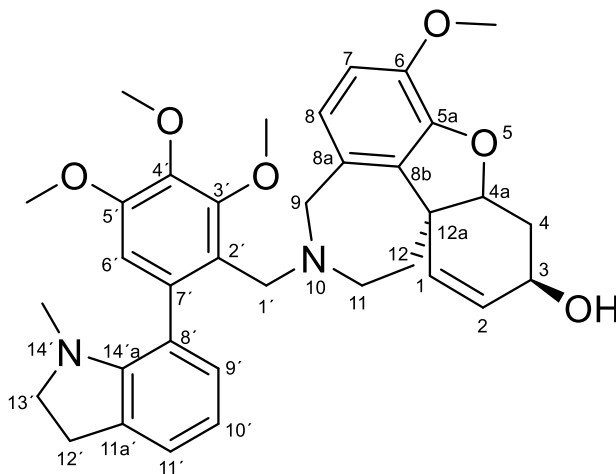
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{23} = +171,4$ ($c=0,175$; CHCl₃)

5.2.6 ZC-6: Narcieliin

Sumární vzorec: C₃₅H₄₀N₂O₆

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) identifikována jako dimerní alkaloid narcikachninového typu ve směsi atropoizomerů (v poměru 1:1,1). Podrobný popis identifikace této nové látky je popsán v následující publikaci Kohelová et al.¹⁷⁴.



Molekulová hmotnost

Mr = 584,70

MS analýza

HRMS (TOF-ESI⁺): *m/z* vypočteno pro C₃₅H₄₁N₂O₆⁺ [M+H]⁺ 585,2959, nalezeno 585,2968

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

7.10 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H11'), 7.04 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H11'), 6.91 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H9'), 6.89 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H9'), 6.72 (1H, t, *J* = 7.5 Hz, H10'), 6.67 (1H, t, překryv, *J* = 7.5 Hz, H10'), 6.65 (1H, s, překryv, H6'), 6.63 (1H, d, překryv, *J* = 8.0 Hz, H7), 6.63 (1H, s, překryv, H6'), 6.56 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H8), 6.55 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H7), 6.25 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H8), 5.99 (1H, d, překryv, *J* = 10.3 Hz, H1), 5.99 (1H, d, překryv, *J* = 10.3 Hz, H1), 5.96–5.89 (2H, m, H2), 4.53 (1H, bs, H4a), 4.36 (1H, bs, H4a), 4.14–4.06 (2H, m, H3), 3.99–3.93 (1H, m, H9), 3.94 (3H, s, překryv, 4'-OCH₃), 3.93 (3H, s, 4' OCH₃), 3.90 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.86 (3H, s, 3' OCH₃) 3.84–3.81 (13H, m, H9, 6 -OCH₃, 5'-OCH₃), 3.70–3.64 (2H, m, H9, H1'), 3.51 (1H, d, *J* = 13.4 Hz, H1'), 3.41 (1H, d, *J* = 13.4 Hz, H1'), 3.34–3.26 (3H, m, H13', H1'), 3.24 (1H, d, *J* = 15.4 Hz, H9), 3.16–3.05 (2H, m, H13'), 3.04–2.80 (7H, m, H11, H12'), 2.68–2.60 (3H, m, H11, H4), 2.19 (3H, s, N14'-CH₃), 2.15 (3H, s, N14'-CH₃), 2.01–1.85 (3H, m, H4, H12), 1.46

(1H, td, $J = 13.4$ Hz, $J = 2.7$ Hz, H12), 1.40 (1H, d, $J = 13.7$ Hz, H12), 1.10 (1H, d, $J = 13.7$ Hz, H12)

^{13}C NMR (125 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):

152.6 (C3'), 152.4 (C3'), 151.8 (C5'), 151.6 (C5'), 150.2 (C14'a), 149.8 (C14'a), 145.6 (C5a), 145.5 (C5a), 143.7 (C6), 143.7 (C6), 141.4 (C4'), 141.1 (C4'), 136.8 (C7'), 136.7 (C7'), 133.4 (C8b), 133.4 (C8b), 131.2 (C8a), 131.1 (C8a), 131.1 (C11'a), 131.0 (C11'a), 130.7 (C9'), 130.6 (C9'), 127.4 (C1), 127.3 (C1), 127.1 (C2), 127.1 (C2), 126.0 (C2'), 126.0 (C2'), 123.4 (C8'), 123.3 (C8'), 123.3 (C11'), 123.2 (C11'), 122.0 (C8), 122.0 (C8), 117.7 (C10'), 117.7 (C10'), 110.8 (C7), 110.8 (C7), 110.3 (C6'), 109.8 (C6'), 88.8 (C4a), 88.8 (C4a), 62.2 (C3), 62.2 (C3), 61.4 (3' OCH₃), 61.3 (3' OCH₃), 60.9 (4' OCH₃), 60.9 (4' OCH₃), 58.8 (C9), 58.8 (C9), 57.0 (C13'), 56.9 (C13'), 56.0 (5' OCH₃), 55.9 (6 OCH₃), 55.9 (6 OCH₃), 55.9 (5' OCH₃), 50.1 (C11), 49.5 (C11), 48.3 (C12a), 48.3 (C12a), 47.0 (C1'), 46.3 (C1'), 38.5 (N14' CH₃), 38.2 (N14' CH₃), 33.8 (C12), 32.8 (C12), 30.0 (C4), 29.9 (C4), 28.7 (C12'), 28.6 (C12')

Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{23} = -55,8$ ($c=0,170$; CHCl_3)

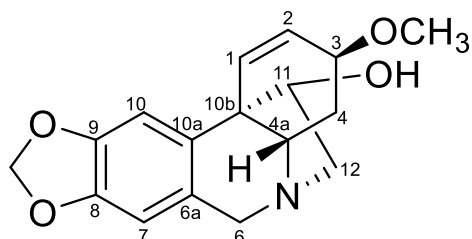
Cirkulární dichroismus

ECD ($c=0,10$ mg/ml, MeOH): λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 240 (-5,89), 255 (+0,14), 260 (-0,43), 284 (+9,79), 317 (-3,03)

5.2.7 ZC-7: Haemanthamin

Sumární vzorec: C₁₇H₁₉NO₄

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid haemanthaminového typu haemanthamin^{175, 176}.



Molekulová hmotnost

Mr = 301,34

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 301(M⁺, 15), 272(100), 240(18), 257(20), 211(16), 181(23)

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

6.74 (1H, s, H-10), 6.41 (1H, s, H-7), 6.36 (1H, d, J = 10.2 Hz, H-1), 6.25 (1H, dd, J = 10.2, 4.7 Hz, H-2), 5.81 (1H, s, OCH₂O), 5.76 (1H, s, OCH₂O), 4.25 (1H, d, J = 17.1 Hz, H-6), 3.96 (1H, dd, J = 6.7, 3.3 Hz, H-11), 3.82 (1H, m, H3), 3.72 (1H, d, J = 17.1 Hz, H-6), 3.36 (3H, s, C3-OCH₃), 3.25-3.30 (2H, m, H12, H-4a), 3.19 (1H, dd, J = 14.1, 3.3 Hz, H-12), 2.11 (1H, ddd, J = 13.8, 5.4, 1.8 Hz, H-4), 1.96 (1H, m, H-4)

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

146.5 (C9), 146.2 (C8), 135.4 (C10a), 132.0 (C6a), 127.4 (C1), 126.9 (C2), 106.9 (C7), 103.3 (C10), 100.8 (OCH₂O), 80.2 (C11), 72.8 (C3), 63.6 (C6), 62.7 (C5), 61.4 (C12), 56.7 (3 OCH₃), 50.1 (C10b), 28.3 (C4).

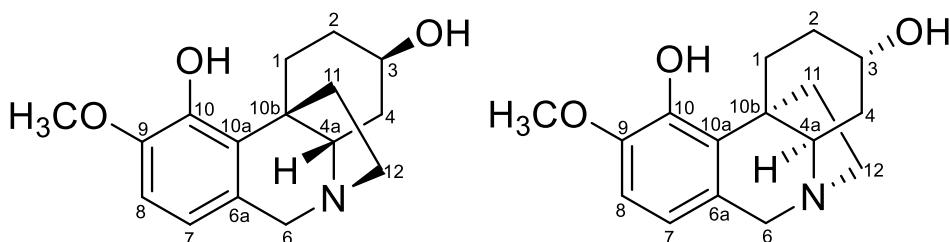
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{23} = +37^\circ$ (c=0,29 CHCl₃)

5.2.8 ZC-8: Zephyjanin

Sumární vzorec: C₁₆H₂₁NO₃

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) identifikována jako nový alkaloid zephyjanin. Dosud byla na základě NMR experimentů určena pouze relativní konfigurace chirálních center vůči sobě. Z posunů je patrné, že vodík 4a směřuje na stejnou stranu jako ethylenový můstek. Napojení kruhů je potom pokrouceno do konformace *cis*-dekalinu. Pro alkaloidy krininového/haemanthaminového typu je charakteristické uspořádání opačné, tzn. uspořádání kruhů typu *trans*-dekalinu. Podrobnější popis řešení relativní konfigurace látky lze najít v disertační práci kolegyně Jany Maříkové, Ph.D.¹⁷². Absolutní konfigurace alkaloidu zephyjaninu je v současné době v řešení. Pro úplnost jsou zde uvedeny oba možné enantiomery.



Molekulová hmotnost

Mr = 275,34

MS analýza

HRMS (TOF-ESI⁺): *m/z* vypočteno pro C₁₆H₂₂NO₃⁺ [M+H]⁺ 276,1594, nalezeno 276,1604; *m/z* vypočteno pro C₁₆H₂₂NO₃Na⁺ [M+Na]⁺ 298,1419, nalezeno 298,1413

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

6.64 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H8), 6.60 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H7), 4.37 (1H, t, *J* = 3.4 Hz, H4a), 4.12–4.07 (1H, m, H3), 3.94 (1H, d, *J* = 15.5 Hz, H6), 3.89 (1H, d, *J* = 15.5 Hz, H6), 3.86 (3H, s, 9-OCH₃), 3.35 (1H, td, *J* = 14.6 Hz, *J* = 3.5 Hz, H12), 3.20–3.12 (1H, m, H12), 2.56–2.48 (1H, m, H4), 1.99–1.93 (1H, m, H11), 1.90 (1H, ddd, *J* = 16.0 Hz, *J* = 4.5 Hz, *J* = 3.3 Hz, H4), 1.86–1.76 (2H, m, H1), 1.74–1.57 (1H, m, H2), 1.66–1.55 (2H, m, H11, H2)

¹³C NMR (125 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

146.4 (C10), 144.0 (C9), 136.6 (C10a), 133.2 (C6a), 120.3 (C7), 110.5 (C8), 89.9 (C4a), 65.5 (C3), 55.9 (9 OCH₃), 54.0 (C6), 47.5 (C12), 47.3 (C10b), 37.8 (C11), 31.5 (C4), 27.7 (C2), 24.0 (C1)

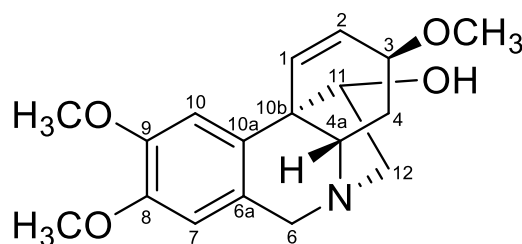
Optická otáčivost

$$[\alpha]_D^{23} = -14,0 \text{ (c=0,200; CHCl}_3\text{)}$$

5.2.9 ZC-9: Zephycitrin I

Sumární vzorec: C₁₈H₂₃NO₄

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) identifikována jako látka haemanthaminového typu a pojmenována jako zephycitrin I. Na základě chemických posunů, které jsou téměř identické chemickým posunům alkaloidu haemanthaminu, a optické otáčivosti byla odvozena relativní konfigurace zephycitrinu I. Podrobnější popis řešení relativní konfigurace látky lze najít v disertační práci kolegyně Jany Maříkové, Ph.D.¹⁷². Potvrzení absolutní konfigurace látky je v současné době v řešení.



Molekulová hmotnost

Mr = 317,38

MS analýza

HRMS (TOF-ESI): m/z vypočteno pro C₁₈H₂₄NO₄⁺ [M+H]⁺ 318,1700, nalezeno 318,1710

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

6.84 (1H, s, H10), 6.52 (1H, d, překryv, $J = 10.0$ Hz, H1), 6.52 (1H, s, překryv, H7), 6.41 (1H, dd, $J = 10.0$ Hz, $J = 4.9$ Hz, H2), 4.42 (1H, d, $J = 16.5$ Hz, H6), 4.06–4.01 (2H, m, H11), 3.91–3.86 (1H, m, překryv, H3), 3.88 (3H, s, překryv, 9-OCH₃), 3.83 (3H, s, 8-OCH₃), 3.79 (1H, d, $J = 16.5$ Hz, H6), 3.48–3.41 (2H, m, H4a, H12), 3.38 (3H, s, překryv, 3-OCH₃), 3.35 (1H, d, překryv, $J = 15.0$ Hz, H12), 2.22–2.03 (2H, m, H4)

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

148.0 (C8), 147.9 (C9), 133.8 (C10a), 132.4 (C2), 126.9 (C1), 125.2 (C6a), 109.7 (C7), 106.3 (C10), 80.0 (C11), 72.7 (C3), 63.3 (C12), 62.9 (C4a), 60.9 (C6), 56.7 (3 OCH₃), 56.1 (9 OCH₃), 55.9 (8 OCH₃), 49.9 (C10b), 28.1 (C4)

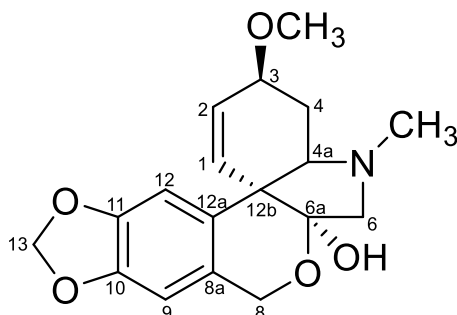
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{23} = +46,0$ ($c=0,200$; CHCl₃)

5.2.10 ZC-10: Tazettin

Sumární vzorec: C₁₈H₂₁NO₅

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid tazettinového typu tazettin¹⁷⁷.



Molekulová hmotnost

Mr = 331,37

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 331 (M⁺, 20), 316 (18), 298 (27), 247 (100), 230 (15).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

6.86 (1H, s, H-12), 6.50 (1H, s, H-9), 6.14 (1H, dt, $J = 10.4, 1.4$ Hz, H-2), 5.90 (2H, s, OCH₂O), 5.61 (1H, dt, $J = 10.4, 1.8$ Hz, H-1), 4.96 (1H, dd, $J = 14.7, 0.5$ Hz, H-8), 4.63 (1H, d, $J = 14.7$ Hz, H-8), 4.11-4.17 (1H, m, H-3), 3.46 (3H, s, OCH₃), 3.30 (1H, d, $J = 10.6$ Hz, H-6), 2.85-2.89 (1H, m, H-6a), 2.68 (1H, d, $J = 10.6$ Hz, H-6), 2.40 (3H, s, NCH₃), 2.19-2.27 (1H, m, H4), 1.63 (1H, ddd, $J = 13.7, 10.1, 2.4$ Hz, H-4).

¹³C NMR (125 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

146.3 (C8), 146.3 (C9), 130.5 (C1), 128.4 (C2), 127.8 (C6a), 125.4 (C10a), 109.1 (C10), 103.7 (C7), 101.7 (C11), 100.2 (OCH₂), 72.4 (C3), 69.9 (C4a), 65.0 (C6), 61.7 (C12), 55.6 (OCH₃), 50.1 (C10b), 41.9 (NCH₃), 26.6 (C4).

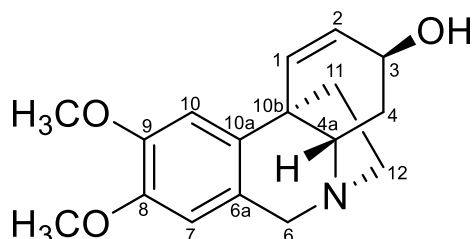
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = + 67,6^\circ$ (c = 0,86; CHCl₃)

5.2.11 ZC-11: Maritidin

Sumární vzorec: C₁₇H₂₁NO₃

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid haemanthaminového strukturního typu maritidin¹⁷⁶.



Molekulová hmotnost

Mr = 287,36

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 287 (M⁺,92), 270(15), 268(17), 258(10), 244(33), 215(100), 203(56), 196(12), 167(8), 128(25), 115(29), 91(11), 77(13)

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ, CD₃OD, 25 °C):

6.97 (1H, s, H-10), 6.71 (1H, d, H-1), 6.66 (1H, s, H-7), 5.93 (1H, dd, H-2), 4.39 (1H, d, H-6β), 4.27 (1H, ddd, H-3), 3.84 (1H, d, H-6α), 3.81 (1H, s, OCH₃), 3.77 (1H, s, OCH₃), 3.48 (1H, dd, H-4a), 3.34 (1H, m, H-12 *exo*), 2.93 (1H, ddd, H-12 *endo*), 2.17 (1H, m, H-11 *exo*), 1.95 (1H, m, H-4β), 1.95 (1H, m, H-11 *endo*), 1.81 (1H, ddd, H-4α)

¹³C NMR (125 MHz, δ, CD₃OD, 25 °C):

149.2 (C8), 149.1 (C9), 138.7 (C10a), 132.3 (C1), 128.6 (C2), 125.8 (C6a), 111.9 (C7), 107.8 (C10), 64.5 (C3), 64.1 (C4a), 62.6 (C6), 56.8 (OCH₃), 56.5 (OCH₃), 54.0 (C12), 45.4 (C10b), 45.0 (C11), 33.5 (C4)

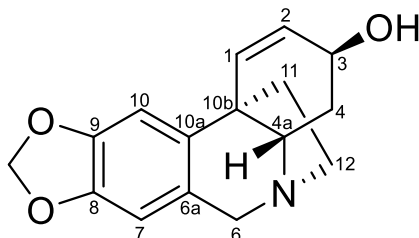
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{23} = + 37,3$ (c=0,150; CHCl₃)

5.2.12 ZC-12: Vittatin

Sumární vzorec: C₁₆H₁₇NO₃

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid haemanthaminového strukturního typu vittatin¹⁷⁶.



Molekulová hmotnost

Mr = 271,32

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 271(M⁺,100), 270(20), 252(35), 199(70), 187(61), 173(22), 115(28)

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

6.87 (1H, s, H-10), 6.53 (1H, s, H-7), 6.44 (1H, d, H-1), 6.06 (1H, dd, H-2), 5.95 (1H, s, OCH₂O), 4.46 (1H, m, H-3), 4.71 (1H, d, H-6 β), 4.07 (1H, d, H-6 α), 3.87 (1H, m, H-4a), 3.87 (1H, m, H-12 *exo*), 3.17 (1H, m, H-12 *endo*), 2.58 (1H, ddd, H-4 β), 2.32 (1H, m, H-11 *exo*), 2.15 (1H, m, H-11 *endo*), 1.85 (1H, ddd, H-4 α)

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

146.0 (C9), 145.6 (C8), 138.3 (C10a), 132.1 (C1), 127.4 (C2), 126.3 (C6a), 106.9 (C7), 102.7 (C10), 100.6 (OCH₂O), 64.0 (C3), 62.8 (C6), 62.3 (C4a), 53.5 (C12), 44.2 (C10b), 44.2 (C11), 32.7 (C4)

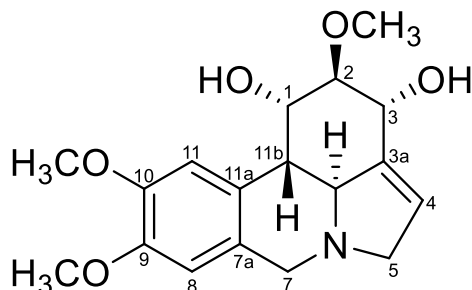
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{23} = +38$ (c=0,165; CHCl₃)

5.2.13 ZC-13: Narcissidin

Sumární vzorec: C₁₈H₂₃NO₅

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid lykorinového strukturního typu narcissidin¹⁷⁸.



Molekulová hmotnost

Mr = 333,38

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 333 (M^+ , 28), 332(25), 315(61), 284(100), 266(42), 258(71), 242(26), 230(87), 228(76), 151(30)

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

6.88 (1H, s, H-10), 6.68 (1H, s, H-7), 5.56 (1H, br s, H-11 α), 4.66 (1H, m, H-1 β), 4.66 (1H, m, H-3 β), 4.09 (1H, d, H-6 β), 3.86 (1H, s, OCH₃), 3.82 (1H, s, OCH₃), 3.54 (1H, d, H-6 α), 3.44 (1H, s, OCH₃), 3.4-4.2 (1H, m, H-2 α), 3.4-4.2 (1H, m, H-4 α), 3.4-4.2 (2H, m, H-12 α), 2.70 (1H, d, H-10b).

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

149.8 (C10), 148.8 (C9), 141.5 (C3 α), 131.8 (C11 α), 129.8 (C7 α), 122.8 (C4), 112.5 (C8), 109.8 (C11), 82.8 (C2), 69.2 (C1), 69.1 (C3), 64.1 (C3 α'), 63.0 (C5), 58.3 (2 OCH₃), 56.8 (10 OCH₃, 9 OCH₃), 55.5 (C7), 42.1 (C11b)

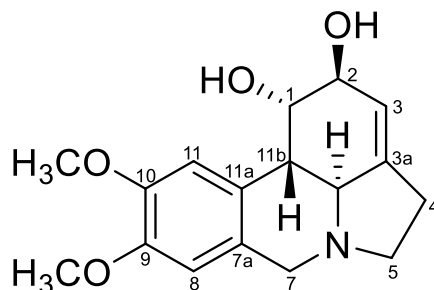
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{23} = -19,4$ (c=0,165; CHCl₃)

5.2.14 ZC-14: Methypseudolykorin

Sumární vzorec: C₁₇H₂₁NO₄

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid lykorinového strukturního typu methypseudolykorin¹⁷⁶.



Molekulová hmotnost

Mr = 303,35

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 303(M⁺, 35), 284(24), 243(86), 242(100)

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

6.96 (1H, s, H-10), 6.75 (1H, s, H-7), 5.55 (1H, m, H-3), 4.53 (1H, dd, H-1), 4.18 (1H, m, H-2 α), 4.16 (1H, d, H-6 β), 3.85 (1H, s, OCH₃), 3.80 (1H, s, OCH₃), 3.55 (1H, dd, H-6 α), 3.35 (1H, ddd, H-12 β), 2.87 (1H, dd, H-4 α), 2.76 (1H, ddd, H-10 β), 2.64 (2H, m, H-11), 2.42 (1H, br q, H-12 α)

¹³C NMR (125 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

149.4 (C10), 149.2 (C9), 143.8 (C3 α), 129.7 (C7 α), 128.7 (C11 α), 119.1 (C3), 112.1 (C8), 109.8 (C11), 73.2 (C2), 71.9 (C1), 62.6 (C3 α'), 57.5 (C7), 56.6 (9 OCH₃), 54.8 (10 OCH₃), 41.3 (C11 β), 29.2 (C4)

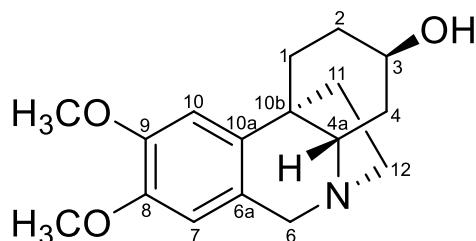
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{23} = -21,2$ (c=0,532; CHCl₃)

5.2.15 ZC-15: Dihydromaritidin

Sumární vzorec: C₁₇H₂₃NO₃

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid haemanthaminového strukturního typu dihydromaritidin¹⁷⁹.



Molekulová hmotnost

Mr = 289,37

MS analýza

MS (EI): *m/z* (%) = 289 (M⁺, 100), 272 (22), 217 (21)

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C): 8

6.69 (1H, s), 6.41, 4.30 (1H, *J* = 17 Hz, N-CH₂-Ar) (1H, s), 4.05-4.30 (1H), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 3.75 (3H, s, OCH₃), 3.70 (1H, *J* = 17 Hz, N-CH₂-Ar), 3.10-3.43 (2H), 2.58-2.94 (1H, m), 2.43 (1H, s), 1.10-2.30 (8H)

¹³C NMR (125 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

147.7 (C₉), 147.5 (C₈), 139.8 (C_{10a}), 123.7 (C_{6a}), 109.1 (C₇), 106.2 (C₁₀), 66.1 (C₃), 63.0 (C_{4a}), 61.3 (C₆), 56.1 (9 OCH₃), 55.9 (8 OCH₃), 51.9 (C₁₂), 42.2 (C_{10b}), 37.1 (C₁₁), 33.2 (C₄), 27.8 (C₂), 22.3 (C₁)

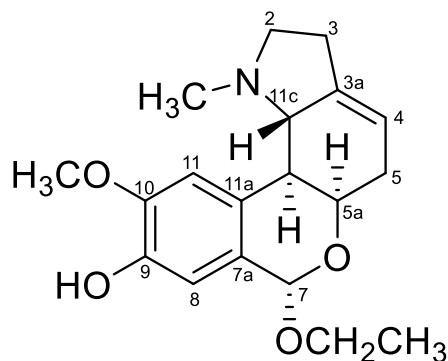
Optická otáčivost

[α]_D²³ = + 43,1 (c=0,165; CHCl₃)

5.2.16 ZC-16: 7-Ethoxy-10-methoxy-1-methyllykorenan-9-ol

Sumární vzorec: C₁₉H₂₅NO₄

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) identifikována jako nový alkaloid homolykorinového strukturního typu 7-ethoxy-10-methoxy-1-methyllykorenan-9-ol.



Molekulová hmotnost

Mr = 331,41

MS analýza

MS (TOF-ESI⁺): *m/z* vypočteno pro C₁₉H₂₆NO₄⁺ [M+H]⁺ 332,1857, nalezeno 332,1968 pro jeden izomer, pro druhý izomer 332,1857, nalezeno 332,1864

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

6.95 (1H, s, H11), 6.75 (1H, s, H8), 5.57 (1H, s, H7), 5.55–5.50 (1H, m, H4), 4.28 (1H, dd, *J* = 5.7 Hz, *J* = 1.8 Hz, H5a), 3.93–3.83 (1H, m, 7-OCH₂-), 3.88 (3H, s, překryv, 10-OCH₃), 3.70 (1H, dq, *J* = 9.7 Hz, *J* = 7.1 Hz, 7-OCH₂-), 3.21 (1H, ddd, *J* = 10.3 Hz, *J* = 7.7 Hz, *J* = 2.8 Hz, H2), 2.86 (1H, d, *J* = 9.7 Hz, H11c), 2.69–2.60 (1H, m, H5), 2.58–2.48 (2H, m, H3), 2.45 (1H, dd, *J* = 9.7 Hz, *J* = 1.8 Hz, H11b), 2.42–2.32 (1H, m, H2), 2.32–2.25 (1H, m, H5), 2.14 (3H, s, N1 CH₃), 1.26 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, 7-OCH₂CH₃)

¹³C NMR (125 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

148.7 (C10), 147.1 (C9), 140.4 (C3a), 130.0 (C11a), 127.7 (C7a), 117.9 (C4), 115.5 (C8), 113.6 (C11), 98.4 (C7), 69.1 (C11c), 68.0 (C5a), 64.6 (7 OCH₂), 57.7 (C2), 56.5 (10 OCH₃), 44.4 (C11b), 44.1 (N1-CH₃), 32.6 (C5), 28.7 (C3), 15.7 (7 OCH₂CH₃)

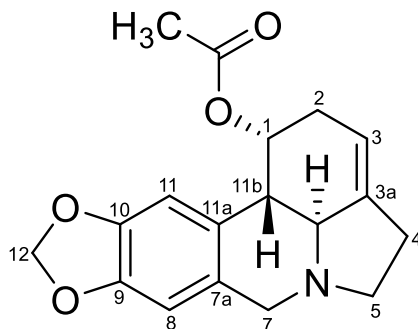
Optická otáčivost

[α]_D²³ = + 113,3 (c=0,180; CHCl₃)

5.2.17 ZC-17: 1-*O*-Acetylkaranin

Sumární vzorec: C₁₈H₁₉NO₄

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid lykorinového strukturního typu 1-*O*-acetylkaranin^{91, 180}.



Molekulová hmotnost

Mr = 313,35

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 313(80), 270(5), 253(20), 252(95), 250(15), 240(10), 225(40), 226(100).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

6.75 (1H, s, H-11), 6.73 (1H, s, H-8), 5.95-5.94 (1H, m, H-1), 5.94 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, překryv, OCH₂O), 5.93 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, překryv, OCH₂O), 5.59 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-3), 4.20 (1H, d, $J = 14.0$ Hz, H-7), 3.99 (1H, d, $J = 14.0$ Hz, H-7), 3.43 (1H, ddd, $J = 10.2, 7.3, 4.9$ Hz, H-5), 3.39 (1H, d, $J = 11.3, 6.2$ Hz, H-13), 3.06-3.00 (1H, m, H-5), 2.89 (1H, d, $J = 11.3$ Hz, H-12), 2.78-2.71 (2H, m, H-11), 2.70 (1H, bd, $J = 19.9$ Hz, H-2), 2.41 (1H, bd, $J = 19.9$ Hz, H-2), 1.92 (3H, s, OCOCH₃)

¹³C NMR (125 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

171.0 (OCOCH₃), 146.5 (C9), 146.2 (C8), 139.6 (C4), 129.5 (C6a), 127.8 (C10a), 114.4 (C3), 107.3 (C7), 105.3 (C10), 101.2 (OCH₂O), 66.6 (C1), 61.5 (C4a), 57.1 (C6), 53.8 (C12), 43.6 (C10b), 33.6 (C2), 27.7 (C11), 21.5 (OCOCH₃)

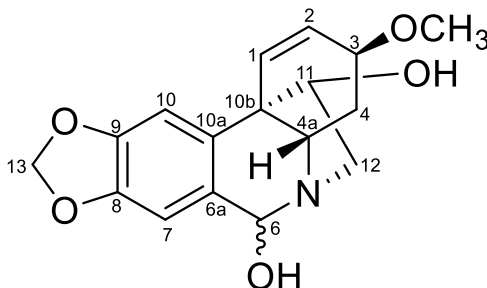
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{23} = -177.5^\circ$ (c = 0,8; CHCl₃)

5.2.18 ZC-18: Haemanthidin

Sumární vzorec: C₁₇H₁₉NO₅

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid haemanthaminového typu ve směsi dvou izomerů (v poměru 7:3 α - a β - izomer) haemanthidin¹⁷⁶.



Molekulová hmotnost

$M_r = 317,34$

MS analýza

MS (EI): m/z (%) =

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

6.94 (1H, s, H-7), 6.70 (1H, s, H-10), 6.33 (1H, d, H-1), 6.27 (1H, dd, H-2), 5.83 (1H, 2d, OCH₂O), 5.69 (1H, s, H-6 β), 4.20 (1H, dd, H-12 *endo*), 3.92 (1H, m, H-11 *endo*), 3.85 (1H, m, H-3), 3.56 (1H, dd, H-4a), 3.32 (1H, s, OCH₃), 2.96 (1H, dd, H-12 *exo*), 2.36 (1H, ddd, H-4 α), 2.12 (1H, ddd, H-4 β)

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

147.4 (C9), 146.5 (C8), 134.7 (C10a), 132.3 (C2), 129.2 (C6a), 126.7 (C1), 108.2 (C7), 102.7 (C10), 101.0 (OCH₂O), 85.8 (C6), 79.2 (C11), 72.5 (C3), 61.6 (C4a), 56.8 (OCH₃), 52.0 (C12), 50.7 (C10b), 27.8 (C4)

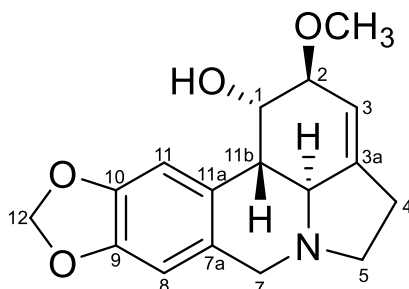
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{23} = -22,3$ (c=0,215; CHCl₃)

5.2.19 ZC-19: Lykorin

Sumární vzorec: C₁₆H₁₇NO₄

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid lykorinového typu lykorin^{181, 182}.



Molekulová hmotnost

Mr = 287,32

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 287 (M⁺, 21), 286 (14), 268 (17), 227 (78), 226 (100), 147 (19), 119 (16), 44 (36).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

6.98 (1H, s, H-11), 6.80 (1H, s, H-8), 5.95 (1H, s, H2-12), 5.77 (1H, br s, H-3), 4.58 (1H, br s, H-1), 4.48 a 4.19 (1H each, d, J = 14.0 Hz, H2-7), 4.26 (1H, m, H-2), 3.95 (1H, d, J = 11.8 Hz, H-11c), 3.75 a 3.49 (1H each, m, H2-5), 2.99 (1H, d, J = 11.8 Hz, H-11b), 2.88 (1H, m, H2-4).

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

149.6 (C9), 148.1 (C10), 137.9 (C3a), 130.7 (C7a), 125.7 (C11a), 122.9 (C3), 108.8 (C8), 106.4 (C11), 102.8 (C12), 71.9 (C2), 70.1 (C1), 61.8 (C11c), 55.1 (C5), 54.2 (C7), 38.2 (C11b), 30.3 (C4).

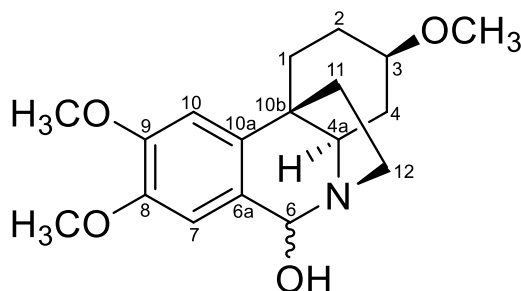
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = -104^\circ$ (c = 0,1; MeOH)

5.2.20 ZC-20: 10-Deoxy-6-hydroxyhippeastidin

Sumární vzorec: C₁₈H₂₅NO₄

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid krininového typu ve směsi dvou izomerů (v poměru 7:3 α - a β - izomer) 10-deoxy-6-hydroxyhippeastidin⁸⁰.



Molekulová hmotnost

$M_r = 319,40$

MS analýza

MS (ESI⁺): $m/z = 320$ [M+H]⁺

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C): 6.93 (1H, s, H-7), 6.89 (1H, s, H-10), 5.73 (1H, s, H-6), 3.89 (1H, m, H-4 α), 3.86 (3H, s, 9-OCH₃), 3.84 (3H, s, 8-OCH₃), 3.81 (1H, m, H-12 α), 3.41 (3H, s, 3-OCH₃), 3.33 (1H, m, H-3), 3.28 (1H, m, H-12 β), 2.63 (1H, m, H-1 β), 2.61 (1H, m, H-11 α), 2.30 (1H, m, H-4 α), 2.23 (1H, brd, 13.6, H-2 α), 1.85 (1H, ddd, 13.8, 13.8, 4.6, H-1 α), 1.75 (1H, ddd, 12.6, 9.5, 3.7, H-11 β), 1.59 (1H, m, H-2 β), 1.48 (1H, ddd, 12.0, 12.0, 12.0, H-4 β),

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C): 151.7 (C9), 150.2 (C8), 137.3 (C10 α), 121.9 (C6 α), 112.6 (C7), 107.2 (C10), 88.7 (C6), 77.3 (C3), 61.5 (C4 α), 56.3 (8 OCH₃), 56.3 (9 OCH₃), 56.1 (3 OCH₃), 47.9 (C 12), 44.3 (C 10 β), 32.5 (C 11), 31.3 (C 4), 27.3 (C 2), 26.0 (C 1)

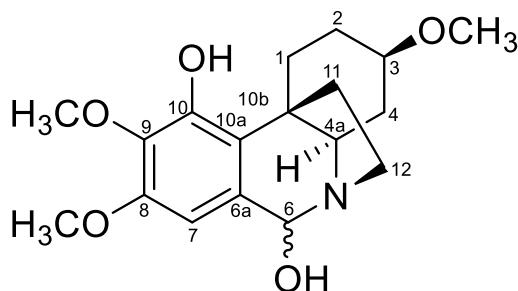
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{23} = +67,4$ (c=0,190; CHCl₃)

5.2.21 ZC-21: 6-Hydroxyhippeastidin

Sumární vzorec: C₁₈H₂₅NO₅

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid krininového typu ve směsi dvou izomerů (v poměru 7:3 α- a β- izomer) 6-hydroxyhippeastidin⁸⁰.



Molekulová hmotnost

$M_r = 335,39$

MS analýza

MS (ESI⁺): $m/z = 336 [M+H]^+$

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C): 6.53 (1H, s, H-7), 5.63 (1H, s, H-6), 3.91 (1H, dd, 12.1, 5.2, H-4a), 3.85 (3H, s, 8-OCH₃), 3.81 (1H, m, H-12α), 3.78 (3H, s, 9-OCH₃), 3.38 (3H, s, 3-OCH₃), 3.37 (1H, m, H-1β), 3.30 (1H, m, H-3), 3.21 (1H, ddd, 12.8, 8.4, 8.4, H-12β), 2.58 (1H, ddd, 11.8, 11.8, 7.4, H-11α), 2.28 (1H, m, C-4α), 2.11 (1H, brd, 13.2, H-2α), 1.89 (1H, m, H-11β), 1.85 (1H, ddd, 14.8, 14.8, 4.4, H-1α), 1.49 (1H, m, H-2β), 1.43 (1H, ddd, 12.1, 12.1, 12.1, H-4β),

¹³C NMR (125 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C): 153.7 (C8), 149.5 (C10), 138.7 (C9), 126.4 (C6a), 123.7 (C10a), 104.7 (C7), 88.7 (C6), 77.4 (C3), 62.6 (C4a), 61.1 (9 OCH₃), 56.4 (8 OCH₃), 56.2 (3 OCH₃), 48.4 (C12), 46.0 (C10b), 31.9 (C4), 31.6 (C11), 27.8 (C2), 26.9 (C1)

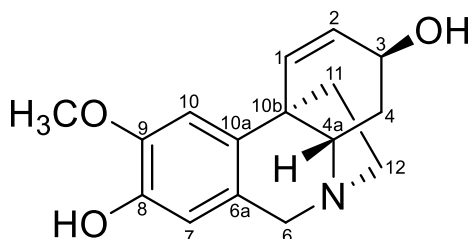
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{23} = + 64,0$ (c=0,175; CHCl₃)

5.2.22 ZC-22: 8-*O*-Demethylmaritidin

Sumární vzorec: C₁₆H₁₉NO₃

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid haemanthaminového strukturního typu 8-*O*-demethylmaritidin^{176, 183}.



Molekulová hmotnost

Mr = 273,33

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 273 (M⁺, 60), 230(23), 201(68), 189(47), 175(21), 157(18), 129(20), 115(26), 91(19), 56(100)

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

6.79 (1H, s, H-10), 6.61 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-1), 6.54 (1H, s, H-7), 5.96 (1H, ddd, J = 10.0, 5.0, < 1 Hz, H-3), 4.37 (1H, d, J = 16.5 Hz, H-6 α), 4.33 (1H, ddd, J = 5.0, 4.0, 1.5, < 1 Hz, H-3), 3.86 (1H, s, 9-OCH₃), 3.76 (1H, d, J = 16.5 Hz, H-6 β), 3.41 (1H, dd, J = 13.5, 4.0 Hz, H-4a), 3.37 (1H, ddd, J = 13.0, 10.5, 4.5 Hz, H-12 *exo*), 2.89 (1H, ddd, J = 13.0, 9.0, 6.0 Hz, H-12 *endo*), 2.17 (1H, ddd, J = 12.5, 9.0, 4.5 Hz, H-11 *endo*), 2.01 (1H, dddd, J = 13.5, 4.0, 1.5, < 1 Hz, H-4 α), 1.92 (1H, ddd, J = 12.5, 10.5, 6.0 Hz, H-11 *exo*), 1.72 (1H, ddd, J = 13.5, 13.5, 4.0 Hz, H-4 β)

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

146.0 (C9), 144.8 (C8), 136.5 (C10a), 130.3 (C1), 127.6 (C2), 121.1 (C6a), 109.8 (C7), 109.2 (C10), 63.3 (C3), 62.8 (C4a), 60.9 (C6), 55.8 (-CH₃), 52.8 (C12), 44.0 (C10b), 42.8 (C11), 31.6 (C4)

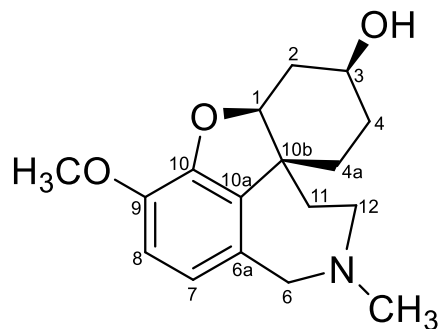
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{23} = +41,3$ ($c=0,155$; CHCl₃)

5.2.23 ZC-23: Lykoramin

Sumární vzorec: C₁₇H₁₇NO₃

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid galanthaminového typu lykoramin^{176, 184}.



Molekulová hmotnost

Mr = Mr = 289,37

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 289 (M⁺, 64), 288 (100), 274 (19), 232 (19), 202 (22), 115 (38).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

6.57 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-8), 6.51 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-7), 4.8 (1H, m, H-1), 3.98 (1H, m, H-3), 3.92 (1H, d, J = 15 Hz, H-6a), 3.76 (3H, s, OCH₃), 3.54 (1H, d, J = 15 Hz, H-6), 3.12 (1H, t, H-12), 2.96 (1H, t, H-12), 2.4 (1H, d, J = 16 Hz, H-2), 2.29 (3H, s, NCH₃), 1.4 – 1.9 (1H, m, H-2), 1.4 – 1.9 (2H, m, H-4), 1.4 – 1.9 (2H, m, H-4a), 1.4 – 1.9 (2H, m, H-11).

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

146.2 (C9), 144.0 (C10), 136.3 (C10a), 129.1 (C6a), 121.6 (C7), 111.3 (C8), 89.8 (C1), 65.2 (C3), 60.4 (C6), 55.9 (OCH₃), 54.1 (C12), 46.7 (C10b), 41.9 (-NCH₃), 31.7 (C4a), 31.5 (C2), 27.6 (C4), 23.9 (C11).

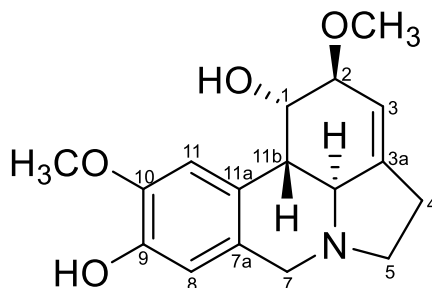
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = + 67^\circ$ (c = 0,269; CHCl₃)

5.2.24 ZC-24: 9-*O*-Demethylgalanthin

Sumární vzorec: C₁₇H₂₁NO₄

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid lykorinového strukturního typu 9-*O*-demethylgalanthin¹²³.



Molekulová hmotnost

Mr = 303,36

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 303 (M⁺, 23), 284 (10), 270 (12), 254 (17), 238 (5), 322 (8), 229 (90), 228 (100), 214 (8), 147 (9).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

6.93 (1H, s, H-10), 6.61 (1H, s, H-7), 5.60-5.58 (1H, m, H-3), 4.61 (1H, br s, H-1), 4.11 (1H, d, J = 13.7 Hz, H-6 α), 3.84 (3H, s, C8-OCH₃), 3.83-3.81 (1H, m, H-2), 3.55 (1H, d, J = 13.7 Hz, H-6 α), 3.49 (3H, s, C₂-OCH₃), 3.34-3.30 (1H, m, H-12 β), 2.79 (1H, br d, J = 10.6, H-4a), 2.68 (1H, br d, J = 10.6 Hz, H-10b), 2.65-2.60 (2H, m, H-11), 2.48-2.40 (1H, m, H-12 α)

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

145.4 (C8), 144.5 (C9), 143.8 (C4), 128.4 (C6a), 127.1 (C10a), 115.6 (C3), 110.5 (C10), 110.2 (C7), 80.8 (C2), 68.1 (C1), 60.9 (C4a), 57.6 (2 OCH₃), 56.6 (C6), 56.0 (8 OCH₃), 53.9 (C12), 41.4 (C10b), 28.7 (C11)

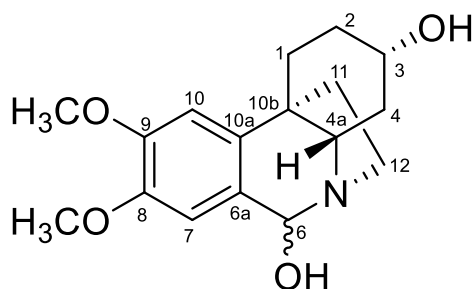
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{23} = -68,0$ (c=0,200; CHCl₃)

5.2.25 ZC-25: Zephycitrin II

Sumární vzorec: C₁₇H₂₃NO₃

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) identifikována jako alkaloid krinanového typu ve směsi izomerů dvou izomerů (v poměru 1:1 α - a β - izomer) a pojmenována jako zephycitrin II. Absolutní konfigurace tohoto alkaloidu byla zjištěna na základě NMR experimentů, podrobnosti lze nalézt v disertační práci Mgr. Jany Maříkové, Ph.D.¹⁷².



Molekulová hmotnost

Mr = 305,37

MS analýza

HRMS (TOF-ESI⁺): *m/z* vypočteno pro C₁₇H₂₄NO₄⁺ [M+H]⁺ 306,1700, nalezeno 306,1716

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

6.84 (1H, s, H7), 6.67 (1H, s, H10), 5.14 (1H, s, H6), 3.89 (3H, s, 9 OCH₃), 3.86 (3H, s, 8-OCH₃), 3.66–3.59 (1H, m, H3), 3.46 (1H, dd, *J* = 12.5 Hz, *J* = 4.9 Hz, H4a), 3.42–3.33 (1H, m, H12), 2.83–2.72 (1H, m, H12), 2.48–2.40 (1H, m, H1), 2.29–2.20 (1H, m, H11), 2.06–1.96 (2H, m, C4, C2), 1.75 (1H, td, *J* = 13.4 Hz, *J* = 4.0 Hz, H1), 1.68–1.53 (2H, m, C11, C2), 1.36 (1H, dt, *J* = 24.0 Hz, *J* = 12.2 Hz, H4);

¹³C NMR (125 MHz, δ , CDCl₃, 25 °C):

148.9 (C9), 147.8 (C8), 139.9 (C10a), 125.4 (C6a), 111.4 (C7), 105.6 (C10), 88.4 (C6), 68.9 (C3), 59.7 (C4a), 56.0 (8 OCH₃), 55.9 (9 OCH₃), 46.5 (C12), 41.9 (C10b), 36.2 (C4), 34.1 (C11), 30.5 (C2), 26.2 (C1)

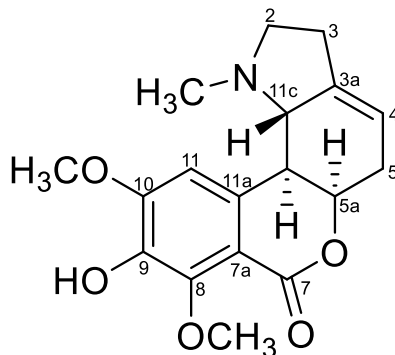
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{23} = + 61,2$ (*c*=0,170; CHCl₃)

5.2.26 ZC-26: 9-*O*-Demethylhomolykorin

Sumární vzorec: C₁₆H₂₁NO₃

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid homolykorinového typu 9-*O*-demethylhomolykorin^{176, 185}.



Molekulová hmotnost

Mr = 301,34

MS analýza

MS (EI): m/z (%) = 192 (M⁺; 0,5), 164 (2), 110 (8), 109 (100), 108 (23), 94 (3), 82 (3).

MS (ESI⁺): m/z (%) = 302 (100) [M+H]⁺, 252 (5), 181 (3).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

7.59 (1H, s, H-8), 6.98 (1H, s, H-11), 5.52 - 5.48 (1H, m, H-4), 4.79 - 4.76 (1H, m, H-5a), 3.94 (3H, s, OCH₃), 3.17 - 3.12 (1H, m, H-2), 2.76 - 2.70 (1H, m, H-11c), 2.66 (1H, dd, $J = 9.7, 2.1$ Hz, H-11b), 2.62 - 2.58 (2H, m, H-5), 2.53 - 2.47 (2H, m, H-3), 2.26 (1H, q, $J = 9.5$ Hz, H-2), 2.00 (3H, s, NCH₃).

¹³C NMR (125 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

165.6 (C7), 150.8 (C10), 145.6 (C9), 140.6 (C3a), 136.7 (C11a), 117.6 (C7a), 116.0 (C8), 115.4 (C4), 110.3 (C11), 77.5 (C5a), 66.5 (C11c), 56.5 (C2), 56.3 (OCH₃), 44.0 (C11b), 43.7 (NCH₃), 31.2 (C5), 27.9 (C3).

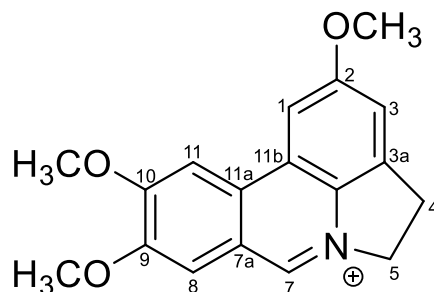
Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = +215,7^\circ$ (c = 0,102; MeOH)

5.2.27 ZC-27: Tortuosin

Sumární vzorec: C₁₈H₁₈NO₃⁺

Látka byla na základě provedených experimentů (MS, NMR, optická otáčivost) a porovnání získaných dat s literaturou identifikována jako alkaloid lykorinového typu tortuosin^{176, 186}.



Molekulová hmotnost

Mr = 296,35

MS analýza

MS (EI): *m/z* (%) = 296 (M⁺, 4), 294 (8), 280 (35), 267 (18), 239 (12), 180 (22), 167 (23), 58 (21), 44 (34), 43 (100).

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

9.55 (1H, s, H-6), 8.34 (1H, s, H-10), 8.13 (1H, d, *J* = 1.4, H-1), 7.92 (1H, s, H-7), 7.59 (1H, br s, H-3), 5.35 (1H, t, *J* = 7.2 Hz, H-12), 4.33 (1H, s, H-9), 4.20 (1H, s, H-2), 4.17 (1H, s, H-8), 3.88 (1H, t, *J* = 7.2 Hz, H-11)

¹³C NMR (125 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

164.5 (C2), 159.1 (C9), 153.1 (C8), 142.6 (C6), 139.7 (C4), 133.0 (C4a), 131.4 (C10a), 126.1 (C10b), 122.9 (C6a), 118.0 (C3), 111.0 (C7), 102.2 (C1), 104.6 (C10), 57.8 (OCH₃), 57.4 (OCH₃), 57.0 (C12), 57.0 (OCH₃), 27.8 (C11)

Optická otáčivost

[α]_D²³ = + 85,7 (c=0,07; CHCl₃)

Tabulka 15: Přehled a množství izolovaných látek

Označení	Název	Izolované množství	Frakce
ZC-1	Galanthin	5,59 g	Fr. 2-6
ZC-2	Buphanisin	5 mg	Fr. 2-3
ZC-3	9-Demethyl-6-choxyhippeastidin	11 mg	Fr. 2-3
ZC-4	10-Deoxy-6 α -ethoxyhippeastidin	9,5 mg	Fr. 2-3
ZC-5	Nerinin	40 mg	Fr. 4
ZC-6	Narcieliin	50 mg	Fr. 4
ZC-7	Haemanthamin	21,22 g	Fr. 5-10
ZC-8	Zephyjanin	60 mg	Fr. 5-6
ZC-9	Zephycitrin I	87 mg	Fr. 5-10
ZC-10	Tazettin	81 mg	Fr. 5-6, 9-10
ZC-11	Maritidin	1,46 g	Fr. 11-15
ZC-12	Vittatin	658 mg	Fr. 11-14
ZC-13	Narcissidin	2,74 g	Fr. 15-17
ZC-14	Methylpseudolykorin	16 mg	Fr. 15
ZC-15	Dihydromaritidin	10 mg	Fr. 15
ZC-16	7-Ethoxy-10-methoxy-1-methyllykorenan-9-ol	15 mg	Fr. 15
ZC-17	1- <i>O</i> -Acetylkarantin	18 mg	Fr. 15
ZC-18	Haemanthidin	12,11 g	Fr. 16-21
ZC-19	Lykorin	9 mg	Fr. 17
ZC-20	10-Deoxy-6-hydroxyhippeastidin	140 mg	Fr. 17, 18, 21
ZC-21	6-Hydroxyhippeastidin	69 mg	Fr. 17, 21
ZC-22	8- <i>O</i> -Demethylmaritidin	1,14 g	Fr. 17, 21
ZC-23	Lykoramin	61 mg	Fr. 20, 21
ZC-24	9- <i>O</i> -Demethylgalanthin	945 mg	Fr. 20, 21
ZC-25	Zephycitrin II	860 mg	Fr. 21
ZC-26	9- <i>O</i> -Demethylhomolykorin	8 mg	Fr. 21
ZC-27	Tortuosin	5 mg	Fr. 4

5.3 Výsledky biologických testů izolovaných alkaloidů

5.3.1 Inhibiční aktivita alkaloidů vůči enzymům ve vztahu k Alzheimerově chorobě

Téměř všechny alkaloidy se podařilo izolovat v množství, které umožnilo screeningové studie vůči enzymovým systémům zapojeným do patofyziologických procesů Alzheimerovy choroby. Konkrétně se jedná o cholinesterázy (*hAChE*, *hBuChE*) a prolyloligopeptidázu (POP) (Tab. 16). Alkaloid narcieliin vykázal zajímavou inhibiční aktivitu vůči cholinesterázám i POP a byl tedy vybrán pro detailnější studie.

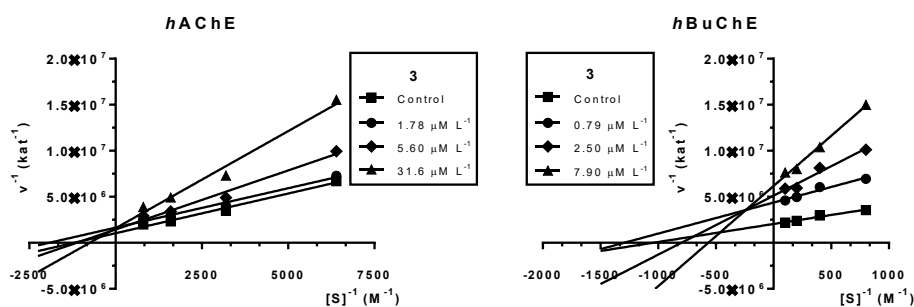
Tabulka 16: Biologická aktivita izolovaných alkaloidů vůči *hAChE* a *hBuChE* a POP

Látka	<i>hAChE</i> IC ₅₀ (μM)	<i>hBuChE</i> IC ₅₀ (μM)	POP IC ₅₀ (μM)
Galanthin	606,92 ± 60,45	> 1000	> 500
Buphanisin	99,21 ± 4,33	> 1000	> 500
Nerinin	> 1000	> 1000	190 ± 10
9-Demethyl-6-ethoxyhippeastidine	> 1000	> 1000	n. t.
10-Deoxy-6α-ethoxyhippeastidin	> 1000	> 1000	n. t.
Narcieliin	18,66 ± 2,28	1,34 ± 0,31	163 ± 13
Haemanthamin	> 1000	> 1000	> 500
Zephyjanin	154,53 ± 2,57	> 1000	160 ± 10
Zephycitrin II	> 1000	> 1000	n. t.
Tazettin	> 1000	> 1000	> 500
Maritidin	> 1000	> 1000	> 500
Vittatin	643,82 ± 65,41	> 1000	n. t.
Narcissidin	> 1000	> 1000	430 ± 20
Methylpseudolykorin	> 1000	> 1000	280 ± 10
Dihydromaritidin	> 1000	> 1000	n. t.
7-Ethoxy-10-methoxy-1-methyllycorenan-9-ol	> 1000	> 1000	> 500
1- <i>O</i> -Acetylkararin	443,68 ± 62,35	141,15 ± 12	> 500
Haemanthidin	> 1000	> 1000	> 500
Lykorin	> 1000	> 1000	> 500
10-Deoxy-6-hydroxyhippeastidin	> 1000	> 1000	220 ± 20
6-Hydroxyhippeastidin	> 1000	> 1000	357 ± 21
8- <i>O</i> -demethylmaritidin	> 1000	> 1000	300 ± 10
Lykoramin	55,79 ± 5,12	> 1000	150 ± 10
9- <i>O</i> -Demethylgalanthin	551,1 ± 76,20	> 1000	146 ± 16
Zephycitrin I	> 1000	> 1000	280 ± 10
Tortuosin	> 1000	> 1000	n. t.
Huperzin A^a	0,033 ± 0,001	> 1000	n. t.
Galanthamin^a	1,7 ± 0,1	42,3 ± 1,3	n. t.
Berberin^a	n. t.		142 ± 21
Z-Pro-prolinal^a	n. t.		2,75 × 10 ⁻³

^astandard, n. t.-neměřeno

5.3.2 Kinetická studie inhibice *hAChE* a *hBuChE* narcieliinu

Vzhledem k významné cholinesterázové inhibiční aktivitě narcieliinu byl podrobně studován i jeho mechanismus inhibice *hAChE* a *hBuChE*. Analýza interakce narcieliinu s cholinesterázami odhalila kompetitivní typ inhibice pro *hAChE* a smíšený typ inhibice pro *hBuChE* ($p < 0,05$). Výsledky jsou prezentovány grafem podle Liweavera-Burka (Obr. 40). V případě *hAChE* se narcieliin reverzibilně váže do aktivního místa enzymu a ovlivňuje tak navázání substrátu. Průsečík čar prochází osou y nad hodnotou 0. Hodnota K_m se zvyšovala s rostoucí koncentrací narcieliinu, zatímco hodnota V_{max} zůstávala s rostoucí koncentrací konstantní. V případě *hBuChE* se průsečík čar nachází nad osou x, což značí reverzibilní typ vazby jak k volnému enzymu, tak ke komplexu enzym-substrát. Afinita byla vyšší k volnému enzymu ($K_i > K_i'$). Hodnota K_m byla při vyšší koncentraci inhibitoru mírně zvýšena, zatímco hodnota V_{max} byla při vyšší koncentraci inhibitoru snížena.



Obrázek 40: Lineweaver-Burkovy grafy

Ustálená inhibice hydrolýzy substrátu *hAChE* a *hBuChE* alkaloidem narcieliinem v různých koncentracích. Lineweaver-Burkovy grafy jsou prezentovány počáteční rychlostí při zvyšování koncentrace substrátu (*hAChE*: 0,1563 - 1 250 mM; *hBuChE*: 2,5 - 20,0 mM). Křivky byly odvozeny z lineární regrese datových bodů.

5.3.3 PAMPA-BBB (Parallel artificial membrane permeation assay)

K predikci pasivní difúze narcieliinu přes HEB byla použita *in vitro* screeningová metoda PAMPA-BBB. Na základě získaných dat *in vitro* permeability ($Pe = 14,1 \pm 1,0 \cdot 10^{-6}$ cm/s) lze odvodit, že by měl být narcieliin schopný přecházet HEB pasivní difúzí (Tab. 17).

Tabulka 17: *In vitro* permeabilita alkaloidu narcieliinu

Sloučenina	PAMPA-BBB permeabilita (Pe ; 10^{-6} cm/s)
Narcieliin	$14,1 \pm 1,0$ (CNS +)
Chlorothiazid	$1,2 \pm 0,5$ (CNS -)
Promazin	$8,6 \pm 0,5$ (CNS +)

CNS (+): vysoká propustnost HEB $Pe > 4,0 \cdot 10^{-6}$ cm/s; CNS (-): nízká propustnost HEB $Pe < 2,0 \cdot 10^{-6}$ cm/s, CNS(+/-): nejistá propustnost HEB Pe v rozmezí $4,0-2,0 \cdot 10^{-6}$ cm/s

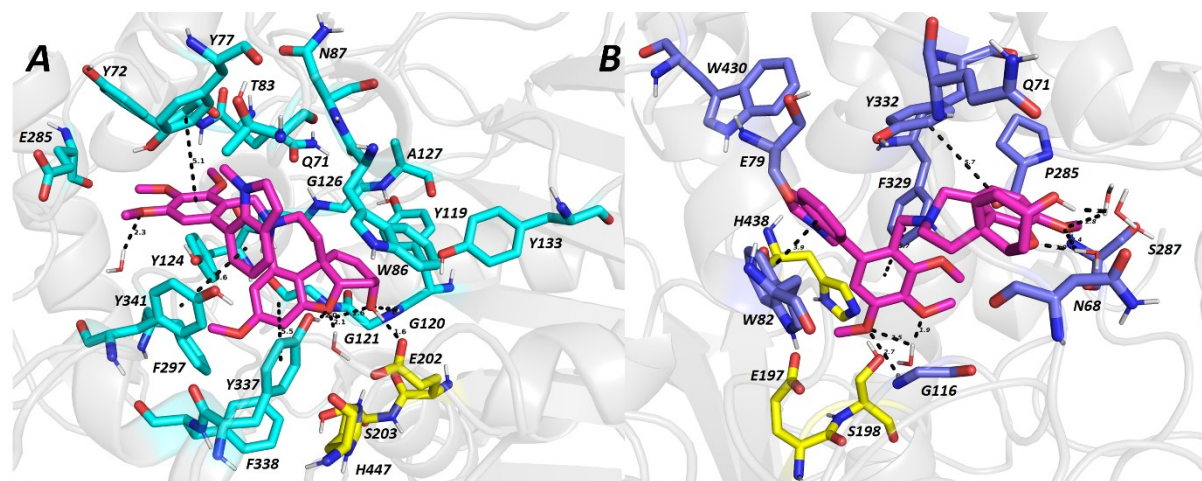
5.3.4 Dockingová studie narcieliinu

hAChE

Narcieliin rozšiřuje katalytické anionické místo (CAS) enzymu několika interakcemi (Obr. 41). Centrálně uložené galanthaminové jádro: i) působí π - π interakcemi s Y337 (5.5 Å), ii) vytváří vodíkové můstky mezi atomem kyslíku 2,3-dihydrofuranu narcieliinu a jednou molekulou vody (2.1 Å) a hydroxy- skupinou Y337 (2.0 Å) enzymu, iii) vytváří síť vodíkových vazeb mezi hydroxy- skupinou narcieliinu a karboxylovou skupinou E202 (1.6 Å) a amidovou kostrou G120 (2.3 Å) a G121 (2.6 Å) enzymu. Galanthindolová část molekuly je obklopena aminokyselinami enzymu (např. W86, A127, G126, F338).

hBuChE

V případě *hBuChE* galanthindolový kruh narcieliinu je zakotven v blízkosti katalytické triády, ale není v přímém kontaktu s touto částí enzymu. 1-Methyl-2,3-dihydro-1H-indolová část narcieliinu je stabilizována π - π interakcemi s W82 (3.9 Å) a hydrofobními interakcemi s E79 a W430 enzymu. 1,2,3-trimethoxybenzenová část narcieliinu působí i) π - π interakcemi s F329 (5.5 Å) a ii) tvorbou vodíkových interakcí prostřednictvím methoxy- skupin a jedné molekuly vody s primárním aminem G116 (2.7 Å). Galanthaminová část narcieliinu je umístěna mimo hrdlo kavity enzymu a vytváří i) řadu hydrofobních interakcí s Y332 (π - π interakce), N68, P285, S287 a Q71, dále tvoří vodíkové vazby se třemi molekulami vody (Obr. 41).



Obrázek 41: Pravděpodobná interakce narcieliinu s aktivními místy *hAChE* (A) a *hBuChE* (B)

Narcieliin je označen růžovou barvou, důležité aminokyselinové zbytky zapojené do interakce enzym-narcieliin jsou zbarveny světle modrou barvou (*hAChE*) a tmavě modrou barvou (*hBuChE*). Katalytická triáda enzymu je znázorněna žlutě. Vzdálenosti jsou zobrazeny čárkovanými čarami. Údaje byly generovány prostřednictvím prohlížeče PyMOL 2.0.6

5.3.5 Výsledky stanovení cytotoxického působení izolovaných alkaloidů

Nejprve byla provedena screeningová single dose studie (při koncentraci 10 μM) na 10 buněčných liniích. V rámci tohoto screeningu byly studovány pouze látky, které byly izolovány na našem pracovišti. Dříve izolované látky opětovně studovány nebyly. Výsledky těchto látek jsou pro přehlednost uvedeny v souhrnné tabulce společně s odkazy na literaturu, kde byla tato data již publikována (Tab. 18). Toto stanovení bylo provedeno ve spolupráci s Ústavem lékařské biochemie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Pro screening byly použity následující nádorové a nenádorové buněčné linie: Jurkat (akutní leukémie T lymfocytů), MOLT-4 (akutní lymfoblastická leukémie), A549 (adenokarcinom plic), HT-29 (kolorektální adenokarcinom), PANC-1 (epiteliální karcinom slinivky), A2780 (karcinom vaječníku), HeLa (adenokarcinom děložního čípku), MCF-7 (adenokarcinom prsu), SAOS-2 (osteosarkom) a MRC-5 (zdravé plicní fibroblasty).

Tabulka 18: Biologická aktivita alkaloidů vůči buňkám nádorových linií (viabilita buněk 48 hodin po ovlivnění alkaloidem při koncentraci 10 µM)

Látka ¹	Jurkat	MOLT-4	A549	HT-29	PANC1	A2780	HeLa	MCF-7	SAOS-2	MRC-5 ³	Ref.
Galanthin	98	103	93	64	97	163	93	114	97	n. t.	¹⁶³
Buphanisin	52	32	60	71	77	55	75	49	76	82	
Nerinin	91	93	101	83	90	95	112	92	105	101	
9-Demethyl-6-ethoxyhippeastidin	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	
10-Deoxy-6α-ethoxyhippeastidin	90	101	100	91	88	85	109	96	98	99	
Narcieliin	103	95	110	106	111	88	90	115	106	111	
Haemanthamin	18	6	33	5	37	38	16	17	34	32	¹⁶³
Zephyjanin	103	99	103	100	103	97	98	97	97	98	
Zephycitrin I	111	99	100	101	102	98	97	106	101	107	
Tazettin	93	95	83	57	76	101	84	94	92	n. t.	¹⁶³
Maritidin	104	100	95	93	91	94	101	98	94	104	
Vittatin	91	92	80	84	84	98	100	79	79	83	
Narcissidin	111	101	113	108	102	101	123	103	101	101	
Methylpseudolykorin	109	103	104	114	109	99	116	104	98	96	
Dihydromaritidin	99	95	88	97	100	107	98	104	97	104	
7-Ethoxy-10-methoxy-1-methyllycorenan-9-ol	98	87	91	91	98	104	92	102	89	110	
1-O-Acetylkararin	132	119	113	107	119	141	98	131	95	n. t.	¹⁶³
Haemanthidin	23	11	38	7	38	52	25	24	35	n. t.	¹⁶³
Lykorin	5	9	27	5	36	39	15	27	27	25	¹⁶³
10-Deoxy-6-hydroxyhippeastidin	96	79	95	95	98	111	106	108	77	100	
6-Hydroxyhippeastidin	89	78	81	88	77	113	82	99	73	97	
8-O-Demethylmaritidin	102	110	106	103	101	101	114	105	98	97	
Lykoramin	102	105	96	83	102	92	82	101	97	n. t.	¹⁶³
9-O-Demethylgalanthin	91	88	83	94	83	125	110	102	71	92	¹⁶³
Zephycitrin II	109	98	117	121	110	105	117	112	111	100	
Tortuosin	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	n. t.	
Doxorubicin²	0	0	66	77	59	5	7	41	73	40	
DMSO (0,1%)⁴	113	115	106	87	95	98	89	99	102	n. t.	

¹c = 10 µmol/l; ²standard, c = 1 µmol/l; ³kontrola – zdravé buňky; ⁴kontrola – DMSO, n. t. – nestudováno

6 DISKUSE

Předložená disertační práce měla za cíl představit Amaryllidaceae alkaloidy jako látky s potenciálem při hledání nových léčiv využitelných v terapii některých chronických onemocnění. V dnešní době se výzkum AAs zaměřuje na hledání látek využitelných v terapii onkologických onemocnění, především z důvodu jejich selektivního účinku na nádorové buňky a relativně nízké toxicitě k zástupcům zdravých buněk^{9, 10, 161}. Nadále je studována inhibiční aktivita vůči cholinesterázám a možnost uplatnění těchto látek v terapii Alzheimerovy choroby. U celé řady extraktů rostlin čeledi Amaryllidaceae a AAs byly dále studovány účinky antimikrobiální, antifungální, antimalarické, protizánětlivé a antioxidační^{10, 13, 37}. Zájem vědecké komunity poutají nejen přirozeně se vyskytující AAs, ale i jejich polosyntetické deriváty. Celá řada biologicky aktivních AAs byla použita jako „lead structure“ pro přípravu nových biologicky aktivnějších látek. Jako příklad lze uvést alkaloidy narciklasin¹⁸⁷, pankratistatin¹⁸⁸ a lykorin¹⁸⁹. Deriváty těchto alkaloidů jsou také intenzivně studovány v kontextu nádorových onemocnění⁹.

Rostlinám čeledi Amaryllidaceae je po fytochemické stránce věnována značná pozornost. Od izolace prvního AAs bylo izolováno přes 600 alkaloidů různých strukturních typů z více než 350 druhů rostlin z čeledi Amaryllidaceae. Rod *Zephyranthes* patří spolu s rody *Crinum*, *Narcissus*, *Galanthus*, *Hippeastrum*, *Lycoris* a *Pancreatium* k nejvíce studovaným rodům této čeledi²². Do dnešní doby bylo fytochemicky studováno 8 druhů rodu *Zephyranthes* (publikováno asi 30 fytochemických prací). Po důkladné literární rešerši bylo zjištěno, že *Z. citrina* byla poměrně málo fytochemicky studována (izolováno 9 alkaloidů)^{85, 86}. Na základě GC/MS a výsledků screeningových studií byl tento druh vybrán jako vhodný zdroj AAs různých strukturních typů a případně dosud nepopsaných alkaloidů, které by mohly disponovat zajímavými biologickými aktivitami.

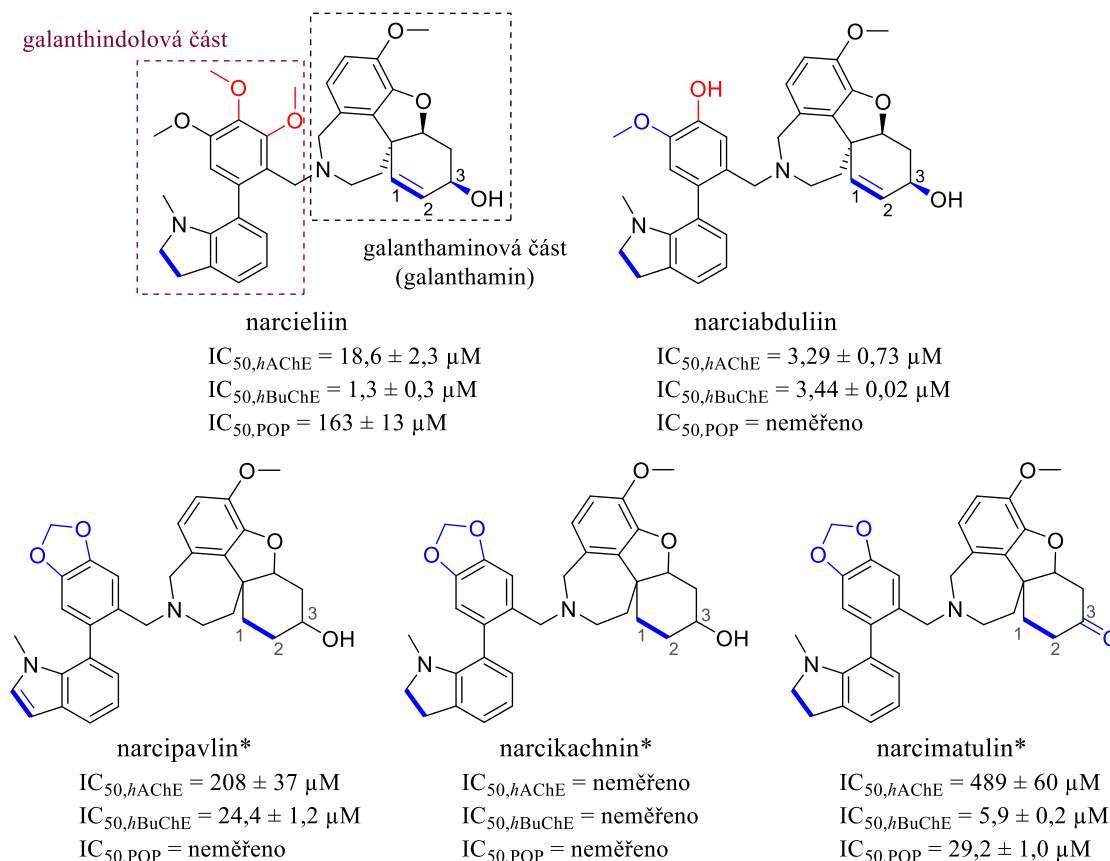
V průběhu fytochemické práce bylo zpracováno 35 kg čerstvých cibulí *Z. citrina*, ze kterých bylo získáno 151 g přečištěného alkaloidního extraktu. Pomocí sloupcové chromatografie, flash chromatografie, preparativní TLC a krystalizace bylo z extraktu izolováno celkem 27 alkaloidů náležících do sedmi strukturních typů. V případě sedmi izolovaných alkaloidů se jednalo o nové dosud nepopsané látky. Pro strukturní analýzu izolovaných látek byly využity běžné spektroskopické metody jako MS (EI, ESI), HRMS, 1D- a 2D- NMR analýza, optická otáčivost a cirkulární dichroismus. Izolované alkaloidy, kromě nově izolovaných látek, patří do následujících strukturních typů: lykorinový (galanthin, narcissidin, 9-*O*-methylpseudolykorin, 1-*O*-acetylkarantin, lykorin, 9-*O*-demethylgalanthin, tortuosin), homolykorinový (nerinin,

9-*O*-demethylhomolykorin), krininový (buphanisin, 10-deoxy-6-hydroxyhippeastidin, 6-hydroxyhippeastidin), haemanthaminový (haemanthamin, maritidin, vittatin, dihydromaritidin, haemanthidin, 8-*O*-demethylmaritidin), tazettinový (tazettin) a galanthaminový (lykoramin). V případě nově izolovaných alkaloidů krininového (9-*O*-demethyl-6-ethoxyhippeastidin, 10-deoxy-6 α -ethoxyhippeastidin) a homolykorinového strukturního typu (7-ethoxy-10-methoxy-1-methyllykorenan-9-ol) se pravděpodobně jedná o izolační artefakty. Tyto látky totiž obsahují ve své struktuře ethoxy- skupinu, která je u přírodních látek vzácná a obvykle vzniká až v průběhu izolačního procesu¹⁹⁰. Dále byly izolovány tři nové alkaloidy haemanthaminového/krininového strukturního typu, tyto látky byly pojmenovány zephycitrin I, zephycitrin II (izolován ve směsi izomerů) a zephyjanin. Na základě provedených experimentů (NMR, CD) nelze s jistotou tvrdit, zda zephycitrin I a zephyjanin patří ke krininovému nebo haemanthaminovému strukturnímu typu, absolutní konfigurace těchto látek je v řešení. Strukturně nejzajímavější nově izolovanou látku představuje alkaloid narcikachninového strukturního typu, který byl pojmenován narcieliin. Struktura alkaloidů narcikachninového typu je tvořena kombinací galanthaminové a galanthidolové části molekuly. Všechny dosud izolované alkaloidy tohoto strukturního typu byly izolovány z rostlin rodu *Narcissus* na našem pracovišti: narcikachnin a narcipavlin (*N. poeticus* cv. Pink Parasol)⁶⁹, narcimatulin (*N. pseudonarcissus* cv. Dutch Master)²⁰ a narciabduliin (*N. pseudonarcissus* cv. Carlton)¹⁹¹. Narcieliin tak představuje první alkaloid narcikachninového typu izolovaný z rostliny rodu *Zephyranthes* a také první alkaloid narcikachninového typu, u kterého byla určena absolutní konfigurace na základě provedených 1D- a 2D- NMR experimentů a CD analýzy¹⁷⁴. Těmto alkaloidům je strukturně blízký alkaloid pallidiflorinového strukturního typu pallidiflorin (*Narcissus pallidiflorus*), jehož struktura je kombinací galanthaminové a tazettinové části¹⁹.

Látky izolované v dostatečném množství byly podrobeny biologickým studiím v souvislosti s možnou terapií Alzheimerovy choroby a nádorových onemocnění. V kontextu AD byly izolované alkaloidy studovány z pohledu jejich inhibičního potenciálu vůči cholinesterázám (*hAChE*, *hBuChE*) a dalším enzymům, které by mohly představovat možné cíle zásahu při léčbě této neurodegenerativní choroby (POP, GSK-3 β). I když se inhibiční aktivita alkaloidního extraktu vůči cholinesterázám jevila slibně ($IC_{50hAChE} = 6,02 \pm 0,55 \mu M$, $IC_{50hAChE} = 22,97 \pm 2,48 \mu M$), tak významný inhibiční efekt vůči těmto enzymům měl pouze nově izolovaný alkaloid narcikachninového typu narcieliin ($IC_{50hAChE} = 18,7 \pm 2,3 \mu M$, $IC_{50hAChE} = 1,34 \pm 0,31 \mu M$). Narcieliin je dosud jediným alkaloidem narcikachninového typu, u kterého byla provedena studie enzymové kinetiky. Prostřednictvím této studie se podařilo objasnit, že

narcieliin vykazuje reverzibilní kompetitivní typ inhibice vůči *hAChE* a smíšený typ inhibice vůči *hBuChE*.

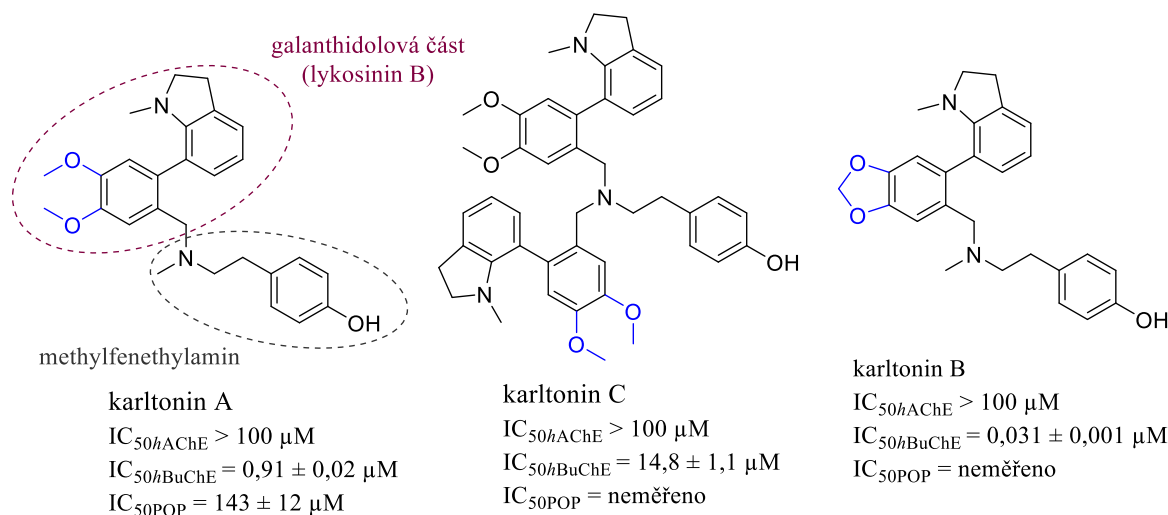
I přesto, že bylo dosud izolováno omezené množství alkaloidů tohoto strukturního typu, lze odvodit několik vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou (Obr. 42).



*Absolutní konfigurace nebyla doposud určena

Obrázek 42: Přehled alkaloidů narcikachninového typu a jejich biologických aktivit

Na základě výsledků screeningových studií vůči cholinesterázám lze usuzovat, že za inhibiční účinek vůči *hAChE* bude zodpovědná galanthaminová část molekuly těchto alkaloidů. Zdá se, že pro inhibiční aktivitu je výhodná dvojná vazba mezi uhlíky C1 a C2 a hydroxy- skupina na uhlíku C3 (narcieliin, narciabduiin). Absence těchto strukturních detailů vede k významnému poklesu aktivity (narcipavlin, narcimatulin)^{174, 191}. Na druhou stranu *hBuChE* je inhibována galanthindolovou částí molekuly. Tento předpoklad vychází ze skutečnosti, že galanthindolový kruh lze najít i ve struktuře alkaloidů karltoninového typu. Tyto alkaloidy, které byly izolovány na našem pracovišti z *N. pseudonarcissus* cv. *Carlton*, inhibují *hBuChE* již v nanomolární koncentraci²⁶ (Obr. 43). Kondenzace galanthindolové části molekuly s methylfenethylaminem vede k dramatickému zvýšení inhibičního účinku na *hBuChE*, jak je tomu právě u alkaloidů karltoninového strukturního typu^{26, 174}.



Obrázek 43: Přehled alkaloidů karltoninového strukturního typu a jejich biologických aktivit

Tyto závěry lze podložit i dockingovou studií narciellinu (Obr. 41). Z *in silico* studie vyplývá, že galanthaminová část narciellinu se dostává do anionického místa *hAChE*. V katalytickém místě působí interakcemi, které se mírně liší od interakcí samotného galanthaminu. Pro interakci galanthaminové části narciellinu s anionickým místem enzymu je důležitá přítomnost kyslíku dihydrofuranu, hydroxylové skupiny na cyklohexenovém kruhu a aromatický kruh. Galanthindolová část molekuly je zakotvena mimo hrdlo kavity enzymu. Narcieliin, limitován svou vysokou molekulovou hmotností ($M_r = 584$), není schopen ovlivnit periferní anionické místo enzymu. Toto strukturní omezení pravděpodobně vede k částečné ztrátě aktivity v porovnání se samotným alkaloidem galanthaminem. Chceme-li vysvětlit vliv narciellinu na *hBuChE*, musíme se zaměřit na galanthindolovou část molekuly. Tato část se váže do blízkosti katalytické triády *hBuChE*, ale není v přímém kontaktu s touto částí enzymu¹⁷⁴.

V literatuře je možné nalézt celou řadu látek, u nichž se získané inhibiční hodnoty IC_{50} na *AChE* značně rozcházejí. Velmi často jedna hodnota přísluší měření, které bylo provedeno na *AChE* z elektrického úhoře (*Electrophorus electricus*) a další hodnota pochází z měření provedeném na lidské *hAChE*. I přesto, že existuje celá řada prací, které se zabývají mezidruhovou variabilitou tohoto enzymu, jsou stále publikovány nové studie, ve kterých byla k měření použita dostupnější *AChE* z elektrického úhoře (*EeAChE*)¹⁹². Jako příklady AAs s rozdílnými hodnotami lze uvést: 1-*O*-acetyllykorin ($IC_{50hAChE} > 100 \mu M$, $IC_{50EeAChE} = 11,7 \mu M$)¹⁴³, 9-*O*-methylpseudolykorin ($IC_{50hAChE} > 100 \mu M$, $IC_{50EeAChE} = 2,84 \mu M$)^{140, 174}, galanthin ($IC_{50hAChE} > 100 \mu M$, $IC_{50EeAChE} = 6,10 \mu M$)^{20, 81}, chlidanthin ($IC_{50hAChE} > 100 \mu M$, $IC_{50EeAChE} = 24,1 \mu M$)^{87, 193} a lykoramin ($IC_{50hAChE} > 100 \mu M$, $IC_{50EeAChE} = 40,12 \mu M$)^{20, 63}.

POP je cytozolický enzym, který je jako možný terapeutický cíl zkoumán od 80. let 20. století. Substrátem tohoto enzymu jsou především neuropeptidy a hormony jako substance P, vasopresin, oxytocin a další. Tyto látky hrají důležitou roli v modulaci funkcí centrálního nervového systému¹⁹⁴. Zapojení POP bylo popsáno u neurodegenerativních onemocnění jako je AD, Parkinsonova choroba a Huntingtonova choroba, ale také u anorexie, mentální bulimie a roztroušené sklerózy^{194,195}. Dle některých studií zasahuje POP do tvorby A β a zřejmě se podílí i na agregaci τ -proteinu¹⁵⁵. POP tak představuje další možný cíl v terapii AD. Jako příklady přírodních látek inhibujících POP lze uvést protoberberinový alkaloid berberin ($IC_{50POP} = 145 \mu M$), flavonoid baikalein ($IC_{50POP} = 36 \mu M$) nebo pavinanový alkaloid kalifornidin ($IC_{50POP} = 55,6 \mu M$)¹⁹⁵. Byla připravena i celá řada syntetických inhibitorů tohoto enzymu (*Z*-pro-prolinal, $IC_{50POP} = 0,74 \text{ nM}$), jejichž společným strukturním rysem je přítomnost acyl-L-prolyl-pyrrolidinového uskupení nebo alespoň pyrrolidinového kruhu v molekule¹⁹⁵. Některé izolované alkaloidy vykazaly inhibiční aktivitu srovnatelnou s berberinem, který byl použit jako standard. Nejzajímavější aktivitu vykazaly narcieliin ($IC_{50POP} = 163 \pm 13 \mu M$), zephyjanin ($IC_{50POP} = 160 \pm 10 \mu M$), lykoramin ($IC_{50POP} = 150 \pm 10 \mu M$) a 9-*O*-demethylgalanthin ($IC_{50POP} = 146 \pm 16 \mu M$)¹⁷⁴.

Dalším možným cílem v terapii AD je enzym GSK-3 β . GSK-3 β ovlivňuje metabolismus glykogenu regulací glykogen-syntázy, dále se uplatňuje v procesech jako embryogeneze, mitotická regulace, zánět a neuroplasticita. Tento enzym hraje důležitou roli v rozvoji AD, diabetu mellitu II. typu a v nádorových onemocněních¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Nejzajímavějšími inhibitory GSK-3 β přírodního původu jsou manzaminové a indolové alkaloidy izolované z různých druhů mořských řas. Hodnoty IC_{50} těchto látek se pohybovaly v rozmezí 2,5 – 10 μM ¹⁹⁶. Z AAs vykazaly nejzajímavější aktivitu alkaloidy homolykorinového typu masonin ($IC_{50} = 27,81 \pm 0,05 \mu M$), 9-*O*-demethylhomolykorin ($IC_{50} = 30,00 \pm 0,71 \mu M$) a lykorinový alkaloid karanin ($IC_{50} = 30,75 \pm 0,04 \mu M$)¹⁴⁸.

Účinnost léčiv vyvíjených k terapii neurodegenerativních onemocnění je mimo jiné podmíněna schopností vyvíjené látky překonat HEB. Schopnost narcieliinu překonat HEB byla predikována prostřednictvím PAMPA testu, který umožňuje posoudit schopnost léčiva překonat HEB pasivní difúzí. Ze získané hodnoty permeability *in vitro* $Pe = 14,1 \pm 1,0 * 10^{-6} \text{ cm/s}$ lze usuzovat, že molekula narcieliinu by měla přecházet přes HEB pasivní difúzí.

V teoretické části byl také podrobně popsán potenciál těchto sloučenin při hledání nových látek využitelných v terapii nádorových onemocnění. V rámci spolupráce s Lékařskou fakultou v Hradci Králové byly izolované alkaloidy testovány *in vitro* na souboru vybraných leukemických a nádorových linií (Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa,

MCF-7 a SAOS-2). I když je většina izolovaných alkaloidů řazena k lykorinovému, haemanthaminovému a krininovému strukturnímu typu, které často disponují cytotoxickou aktivitou, tak jedinými cytotoxicky aktivními látkami byly haemanthamin, haemanthidin, lykorin a buphanisin. Cytotoxická aktivita prvních třech látek je v literatuře dobře známá, existuje i celá řada studií, které objasňují mechanismus účinku uvedených alkaloidů⁹. Buphanisin, alkaloid krininového strukturního typu, vykázal zajímavou inhibiční aktivitu vůči buněčné linii akutní lymfoblastické leukémie (MOLT-4) a vůči buněčné linii adenokarcinomu prsu (MCF-7). Buphanisin byl na našem oddělení izolován již v rámci fytochemické studie provedené na cibulích *Nerina bowdenii*. V rámci této práce bylo zjištěno, že látka vykazuje cytotoxické účinky vůči nádorovým liniím kolorektálního adenokarcinomu (Caco-2 a HT-29), byly získány hodnoty $IC_{50} = 8,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$ pro buněčnou linii Caco-2 a $IC_{50} = 5,3 \pm 1,7 \mu\text{M}$ pro linii HT-29¹⁴³. Vzhledem k tomu, že se podařilo získat jen malé množství této látky, nebylo možné provést podrobnější studie.

Závěrem lze konstatovat, že z 35 kg čerstvých cibulí *Z. citrina* bylo izolováno 27 AAs, ve čtyřech případech se jednalo o látky dosud nepopsané (narcieliin, zephyjanin, zephycitrin I, zephycitrin II). Většina alkaloidního extraktu byla tvořena alkaloidy haemanthaminového strukturního typu. Řada z nich se podařila získat řádově v množství gramů (haemanthamin, maritidin, vittatin). Tyto látky byly použity jako výchozí materiál pro přípravu polosyntetických derivátů za účelem rozšíření portfolia studovaných látek. Z hlediska biologické aktivity představoval nejzajímavější strukturu nově izolovaný heterodimerní alkaloid narcieliin, který vykázal inhibiční účinek vůči *hAChE*, *hBuChE* a POP. Narcieliin byl izolován v množství, které umožnilo pouze několik základních testů, proto bude využit jako strukturní předloha pro vývoj látek s kombinovaným inhibičním účinkem vůči *hAChE*, *hBuChE* a POP.

7 ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky

Kandidát: **Mgr. Eliška Kohelová**

Školitel: **prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.**

Název disertační práce: **Alkaloidy *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae): izolace, strukturní identifikace, biologická aktivita.**

Klíčová slova: Amaryllidaceae alkaloidy, *Zephyranthes*, Alzheimerova choroba, AChE, BuChE, POP, GSK-3 β , nádorová onemocnění

Rostlina *Zephyranthes citrina* Baker byla na základě screeningové studie a literární rešerše vybrána pro podrobnou fytochemickou práci za účelem zisku co nejširšího spektra Amaryllidaceae alkaloidů. Z 35 kg čerstvých cibulí bylo získáno 151 g přečištěného alkaloidního extraktu, který byl rozdělen pomocí sloupcové chromatografie na téměř 700 frakcí. Tyto frakce byly na základě kontrolní TLC spojeny do 21 podfrakcí, z nichž bylo pomocí extrakce kapalina-kapalina, flash chromatografie, preparativní TLC a krystalizace izolováno 27 alkaloidů. Všechny látky byly identifikovány pomocí MS (EI, ESI), HRMS, 1D- a 2D-NMR, CD, optické otáčivosti a porovnáním dat s literaturou. U sedmi z nich se jednalo o nové dosud nepopsané struktury (6 α -ethoxyhippeastidin, 10-deoxy-6 α -ethoxyhippeastidin, narcieliin, zephyjanin, zephycitrin I, 7-ethoxy-10-methoxy-1-methyllykorenan-9-ol a zephycitrin II). Všechny alkaloidy izolované v dostatečném množství byly podrobeny testům jejich biologické aktivity spojené s Alzheimerovou chorobou (inhibice hAChE, hBuChE, POP) a nádorovými onemocněními.

Inhibice erytrocytární hAChE a sérové hBuChE byla stanovena pomocí modifikované Ellmanovy metody. Nejzajímavější aktivitu vůči cholinesterázám vykázal nově izolovaný alkaloid narcikachninového strukturního typu narcieliin ($IC_{50hAChE} = 18,7 \pm 2,3 \mu M$, $IC_{50hAChE} = 1,34 \pm 0,31 \mu M$). Prostřednictvím studie enzymové kinetiky byla objasněna interakce mezi narcieliinem a hAChE a hBuChE. Dále byla provedena predikce průchodu narcieliinu přes HEB za využití PAMPA-BBB studie. *In vitro* data byla podpořena *in silico* studiemi narcieliinu v aktivním místě hAChE/hBuChE.

Stanovení inhibice vůči POP bylo provedeno spektrofotometricky. Některé látky vykázaly aktivitu srovnatelnou s použitým standardem berberinem ($IC_{50} = 142 \pm 21 \mu M$) a to narcieliin

($IC_{50} = 163 \pm 13 \mu M$), zephyjanin ($IC_{50} = 160 \pm 10 \mu M$), lykoramin ($IC_{50} = 150 \pm 10 \mu M$) a 9-*O*-demethylgalanthin ($IC_{50} = 146 \pm 16 \mu M$).

Izolované alkaloidy byly podrobeny screeningu viability po dobu 48 hodin na devíti nádorových liniích (Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7 a SAOS-2) a jedné zdravé (MRC-5) buněčné linii. Jedinými cytotoxicky aktivními látkami byly haemanthamin, haemanthidin, lykorin a buphanisin.

Na základě získaných výsledků je možné konstatovat, že rostlina *Z. citrina* představuje zajímavý zdroj celé řady biologicky aktivních látek s potenciálem pro další studium.

8 ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany

Candidate: **Mgr. Eliška Kohelová**

Supervisor: **prof. Ing. Lucie Cahliková, Ph.D.**

Title of Doctoral Thesis: **Alkaloids of *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae): isolation, structure identification, biological activity.**

Key words: Amaryllidaceae alkaloids, *Zephyranthes*, Alzheimer's disease, AChE, BuChE, POP, oncological diseases

Zephyranthes citrina Baker was chosen, based on result of previous screening study and literary research, for detailed phytochemical work for the purpose of isolation of the widest range of AAs. From 35 kg of fresh bulbs was obtained 151 g of purified alkaloidal extract, which was processed using column chromatography to almost 700 fractions. These fractions were connected into 27 subfractions, which were processed by liquid-liquid extraction, flash chromatography, preparative TLC and crystallization. Finally, 27 pure alkaloids were isolated. All compounds were identified by MS (EI, ESI), HRMS, 1D- and 2D-NMR, CD, optical rotation and by comparison with literature data. Seven compounds were identified as new undescribed alkaloids (6 α -ethoxyhippeastidine, 10-deoxy-6 α -ethoxyhippeastidine, narcieliine, zephyjanine, zephycitrine I, 7-ethoxy-10-methoxy-1-methyllycorenane-9-ol a zephycitrin II). All alkaloids isolated in sufficient amount were tested for their biological activities associated with Alzheimer's disease (inhibition of *h*AChE, *h*BuChE, POP) and oncological diseases.

Inhibition of erythrocytic *h*AChE and serum *h*BuChE was determined by modified Ellman's method. Significant *h*AChE and *h*BuChE inhibitory activity was demonstrated by the newly described alkaloid narcieliine, with IC₅₀ values of 18.7 \pm 2.3 μ M and 1.34 \pm 0.31 μ M, respectively. To evaluate the interactions of narcieliine with *h*AChE and *h*BuChE a kinetic study was conducted. This compound was also predicted to cross the blood-brain barrier through passive diffusion (PAMPA-BBB assay). The *in vitro* data were further supported by *in silico* studies of narcieliine in the active site of *h*AChE/*h*BuChE.

Determination of POP inhibition was performed by spectrophotometric method. Four compounds showed activity comparable to used standard berberine (IC₅₀ = 142 \pm 21 μ M): narcieliine (IC₅₀ = 163 \pm 13 μ M), zephyjanine (IC₅₀ = 160 \pm 10 μ M), lycoramine (IC₅₀ = 150 \pm 10 μ M) and 9-*O*-demethylgalanthine (IC₅₀ = 146 \pm 16 μ M).

All isolated alkaloids went through the screening of cytotoxic activity on nine cancer cell lines (Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7 a SAOS-2) and one healthy cell line (MRC-5). Only haemanthamine, haemanthidine, lycorine and buphanisine showed cytotoxic activity.

Based on obtained results, *Z. citrina* can be recognized as a rich source of biologically active alkaloids with potential for further study.

9 PŘEHLED PUBLIKACÍ A KONFERENCÍ

9.1 Původní práce

9.1.1 Práce související s disertační prací

Kohelová, E., Peřinová, R., Maafi, N., Korábečný, J., Hulcová, D., Maříková, J., Kučera, T., González, L. M., Hrabínová, M., Vorčáková, K., Nováková, L., De Simone, A., Havelek, R., Cahlíková, L. (2019) Derivatives of the β -crinane Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine as multi-target directed ligands for Alzheimer's disease. *Molecules*. 24, 1307. (IF₂₀₂₀=4,411)

Podíl studentky na publikaci: izolace alkaloidu haemanthaminu, příprava polosyntetických derivátů haemanthaminu, strukturní identifikace připravených derivátů (MS, optická otáčivost), příprava derivátů pro biologické testy, sepsání experimentální části práce.

Peřinová, R., Maafi, M., Korábečný, J., Kohelová, E., De Simone, A., Al Mammun, A., Hulcová, D., Marková, J., Kučera, T., Jun, D., Šafratová, M., Maříková, J., Andrisano, V., Jenčo, J., Kuneš, J., Martinez, A., Nováková, L., Cahlíková, L. (2020) Functionalized aromatic esters of the Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine and their *in vitro* and *in silico* biological activity connected to Alzheimer's disease. *Bioorganic Chemistry*. 100, 103928. (IF₂₀₂₀=4,831)

Podíl studentky na publikaci: izolace alkaloidu haemanthaminu, strukturní identifikace připravených derivátů (MS, optická otáčivost), převedení derivátů haemanthaminu na hydrochloridy.

Kohelová, E., Maříková, J., Korábečný, J., Hulcová, D., Kučera, T., Jun, D., Chlebek, J., Jenčo, J., Šafratová, M., Hrabínová, M., Ritomská, A., Malaník, M., Peřinová, R., Breiterová, K., Kuneš, J., Nováková, L., Opletal, L., Cahlíková, L. (2021) Alkaloids of *Zephyrantes citrina* (Amaryllidaceae) and their implication to Alzheimer's disease: isolation, structural elucidation and biological activity. *Bioorganic Chemistry*. 107, 104567. (IF₂₀₂₀=4,831)

Podíl studentky na publikaci: provedení veškerých izolačních prací, strukturní identifikace izolovaných látek (MS, optická otáčivost), příprava látek na biologické testy, sepsání experimentální částí práce a kompletování manuskriptu.

Maříková, J., Al Mammun, A., Al Shammari, L., Korábečný, J., Kučera, T., Hulcová, D., Kuneš, J., Malaník, M., Vašková, M., Kohelová, E., Nováková, L., Cahlíková, L., Pour, M. (2021) Structure Elucidation and cholinesterase inhibition activity of two new minor Amaryllidaceae alkaloids. *Molecules*. 26. (IF₂₀₂₀=4,411)

Podíl studentky na publikaci: zapojení do izolace alkaloidu narciabdulinu.

9.1.2 Ostatní práce

Breiterová, K., Ločárek, M., Kohelová, E., Talácková, M., Hulcová, D., Opletal, L., Cahlíková, L. (2018) Daffodils as potential crops of biologically-active compounds: Assessment of 40 ornamental taxa for their alkaloid profile and cholinesterases inhibition activity. *Natural Product Communications*. 13, 419-422. (IF₂₀₂₀=0.960)

Podíl studentky na publikaci: příprava několika alkaloidních extraktů, analýza alkaloidních extraktů pomocí GC/MS, příprava extraktů na biologické testy.

Maříková, J., Ritomská, A., Korábečný, J., Peřinová, R., Al Mammun, A., Kučera, T., Kohelová, E., Hulcová, D., Kobrlová, T., Kuneš, J., Nováková, L., Cahlíková, L. (2020) Aromatic esters of the crinane Amaryllidaceae alkaloid ambelline as selective inhibitors of butyrylcholinesterase. *Journal of Natural Products*. 83, 1359-1367. (IF₂₀₂₀=4,050)

Podíl studentky na publikaci: příprava některých polosyntetických derivátů ambellinu, převedení derivátů ambellinu na hydrochloridy, příprava látek na biologické testy.

Maafi, N., Pidaný, F., Maříková, J., Korábečný, J., Hulcová, D., Kučera, T., Schmidt, M., Al Shammari, L., Špulák, M., Catapano, M. C., Mecava, M., Prchal, L., Kuneš, J., Janoušek, J., Kohelová, E., Nováková, L., Cahlíková, L. (2021) Derivatives of montanine-type alkaloids and their implication for the treatment of Alzheimer's disease: synthesis, biological activity and in silico study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. (submitted)

Podíl studentky na publikaci: převedení derivátů montaninu na hydrochloridy, příprava látek na biologické testy.

9.2 Konference

9.2.1 **Přednášky**

Kohelová E., Kuneš J., Opletal L., Cahlíková L.: Alkaloidy izolované z *Narcissus* cv. PROFESSOR EINSTEIN. Book of abstracts, XXV. Studentská vědecká konference FaF UK, Hradec Králové, Česká republika, 2017.

Kohelová, E., Kuneš, J., Cahlíková L.: Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes citrina*. Book of abstracts, 8. Postgraduální a 6. postdoktorandská vědecká konference FaF UK, Hradec Králové Česká republika, 2018.

Kohelová, E., Jenčo, J., Hulcová, D., Maříková, J., Cahlíková L.: Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes citrina*. Book of abstracts, Synthesis and analysis of drugs conference, Brno, Česká republika, 2018.

Kohelová, E., Kuneš J., Cahlíková L., Opletal L.: Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes citrina*. Book of abstracts, 9. Postgraduální a 7. postdoktorandská vědecká konference FaF UK, Hradec Králové Česká republika, 2019.

Kohelová, E., Jenčo, J., Cahlíková L., Maříková, J.: Separation of stereoisomers of *Zephyranthes citrina*. Book of abstracts, 10. Postgraduální a 8. postdoktorandská vědecká konference FaF UK, Hradec Králové Česká republika, 2020.

Kohelová, E., Hulcová, D., Maříková, J., Cahlíková L.: Alkaloids of *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae) and their implication to Alzheimer's disease: Isolation, structure elucidation and biological activity. 11. Postgraduální a 9. postdoktorandská vědecká konference FaF UK, Hradec Králové Česká republika, 2021.

9.2.2 **Posterové prezentace**

Kohelová, E., Maříková, J., Cahlíková, L.: Alkaloids from *Zephyranthes citrina* and their biological activity. Euroindoamerican natural products meeting, Madrid, Španělsko, 2018.

Kohelová, E., Maříková, J., Cahlíková, L., Koutová, D.: Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes citrina* and their biological activity. Natural products in drug discovery and human health, Lisabon, Portugalsko, 2019.

Kohelová, E., Jenčo, J., Hulcová, D., Maříková, J., Cahlíková, L.: Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes citrina*. Synthesis and analysis of drugs conference, Bratislava, Slovenská republika, 2019.

9.3 Účelová finanční podpora

Kohelová, E., Cahlíková, L., Havelek, R., Koutová, D., Breiterová, K., Maříková, J.: Studium cytotoxické aktivity alkaloidů *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae) a jejich polosyntetických derivátů, Study of cytotoxic activity of *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae) alkaloids and their semisynthetic analogues. GA UK, č. projektu 178518.

Opletal, L.: Modernizace laboratoře buněčných interakcí s látkami přírodního původu (MOLABI). OPVVV: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_017/0002682: MŠMT ČR/Univerzita Karlova v Praze.

10 LITERATURA

1. Petrovska, B. B., Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews* **2012**, *6* (11), 1-5.
2. Tomko, J., Kresánek, J., Hubík, J., Suchý, V., Felklová, M. and B. Sikyta *Farmakognózia*. Osveta: Banská Bystrica, 1999; p 424.
3. Siatka, T. Přírodní látky-potenciální zdroje a biologická aktivita. Habilitační práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2019.
4. Evans, W. C., *Trease and Evans Pharmacognosy*. Elsevier: 2009; p 616.
5. Upton, R., Graff, A., Jolliffe, G., Länger, R. and E. Williamson, *American herbal pharmacopoeia: botanical pharmacognosy-microscopic characterization of botanical medicines*. CRC Press: Boca Raton, 2011.
6. Opletal, L., Prolegomenon české farmakognozie: 21. století. *Česká a slovenská farmacie* **2013**, *2* (62), 99-102.
7. David, B., J.-L., Wolfender and D. A. Dias, The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochemistry Reviews* **2015**, *14* (2), 299-315.
8. He, M., Qu, Ch., Gao, O., Hu, X. and X. Hong, Biological and pharmacological activities of amaryllidaceae alkaloids. *RSC Advances* **2015**, *5* (21), 16562-16574.
9. Nair, J. J.; Van Staden, J.; Bastida, J., Cytotoxic alkaloid constituents of the Amaryllidaceae. In *Studies in natural products chemistry*, Elsevier: 2016; Vol. 49, pp 107-156.
10. Jin, Z.; Yao, G., Amaryllidaceae and *Scelletium* alkaloids. *Natural Products Reports* **2019**, *36* (10), 1462-1488.
11. Stevens, P. F. Angiosperm Phylogeny Website [online]. [cit. 2021-10-01]. Dostupné z: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
12. Rao, V., *Phytochemicals: A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. Book on Demand: 2012.
13. Jin, Z. a. X. H. X., *Amaryllidaceae alkaloids*. Natural Products, Berlin Heidelberg: Springer 2013.
14. Chrtek, J., Kaplan Z. and J. Štěpánková, *Květena České republiky* **8**. Academia: 2011; p 712.
15. Takos, A. M. a. F. R., Towards a molecular understanding of the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medical use. *International Journal of Molecular Sciences* **2013**, *14* (6), 11713-41.
16. Hooker, J. D., Plants of the royal gardens of kew. *Curtis's Botanical Magazine* **1875**, *31*.
17. Sims, J., Plants of the royal gardens of kew. *Curtis's Botanical Magazine* **1839**, *29*.
18. Hans, G., *Narcissus and Daffodil: The Genus Narcissus*. Taylor & Francis: 2002; p 428.
19. Codina; Codina, C.; Viladomat, F.; Bastida, J.; Rubiralta, M.; Quirion, J.-C., A heterodimer alkaloid from *Narcissus pallidiflorus*. *Phytochemistry* **1990**, *29* (8), 2685-2687.
20. Hulcova, D.; Marikova, J.; Korabecny, J.; Hostalkova, A.; Jun, D.; Kunes, J.; Chlebek, J.; Opletal, L.; De Simone, A.; Novakova, L.; Andrisano, V.; Ruzicka, A.; Cahlikova, L., Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease. *Phytochemistry* **2019**, *165*.
21. Desgagne-Penix, I., Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants: a review. *Phytochemistry Reviews* **2020**.
22. Berkov, S., Osorio, E., Viladomat, F. and J. Bastida, *The Alkaloids: Chemistry and Biology*. Academic Press: 2020; Vol. 83, p 252.
23. Ghosal, S.; Kumar, Y.; Chakrabarti, D.; Lal, J.; Singh, S., Parasitism of *Imperata cylindrica* on *Pancreatium biflorum* and the concomitant chemical changes in the host species. *Phytochemistry* **1986**, *25* (5), 1097-1102.

24. Ghosal, S.; Shanthi, A.; K. Singh, S., Isocraugsodine, an *N*-arylidenephenethylamine from *Crinum asiaticum* and its *E/Z* isomerism. *Phytochemistry* **1988**, *27* (6), 1849-1852.
25. Bastida, J., Berkov, S., Torras, L., Pigni, L.B., de Anrade, J.P., Martínez, V., Codina, C. and F. Viladomat, *Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids*. Kerala, India ed.; Transworld Research Network: 2011; p 282.
26. Al Mamun, A.; Marikova, J.; Hulcova, D.; Janousek, J.; Safratova, M.; Novakova, L.; Kucera, T.; Hrabina, M.; Kunes, J.; Korabecny, J.; Cahlikova, L., Amaryllidaceae alkaloids of belladine-type from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton as new selective inhibitors of butyrylcholinesterase. *Biomolecules* **2020**, *10* (5), 800.
27. Wang, J. L.; Li, J. N.; Shen, X. W.; Dong, C.; Lin, J.; Wei, K., Asymmetric total synthesis of (-)-delta-lycorane. *Organic Chemistry Frontiers* **2017**, *4* (6), 1149-1152.
28. Elgorashi, E. E.; Drewes, S. E.; van Staden, J., Alkaloids from *Crinum moorei*. *Phytochemistry* **2001**, *56* (6), 637-640.
29. Evidente, A.; Arrigoni, O.; Liso, R.; Calabrese, G.; Randazzo, G., Further experiments on structure-activity relationships among the lycorine alkaloids. *Phytochemistry* **1986**, *25* (12), 2739-2743.
30. Schwartz, B. D.; White, L. V.; Banwell, M. G.; Willis, A. C., Structure of the lycorinine alkaloid nobilisitine A. *Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76* (20), 8560-8563.
31. Cimmino, A.; Masi, M.; Evidente, M.; Superchi, S.; Evidente, A., Amaryllidaceae alkaloids: Absolute configuration and biological activity. *Chirality* **2017**, *29* (9), 486-499.
32. Suau, R.; Gomez, A. I.; Rico, R.; Tato, M. P. V.; Castedo, L.; Riguera, R., Alkaloid *N*-oxides of Amaryllidaceae. *Phytochemistry* **1988**, *27* (10), 3285-3287.
33. Ding, Y.; Qu, D.; Zhang, K. M.; Cang, X. X.; Kou, Z. N.; Xiao, W.; Zhu, J. B., Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review. *Journal of Asian Natural Products Research* **2017**, *19* (1), 53-100.
34. Lewis, J. R., Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Natural Product Reports* **1996**, *13* (2), 171-176.
35. Refaat, J.; Kamel, M. S.; Ramadan, M. A.; Ali, A. A., *Crinum*; an endless source of bioactive principles: a review. Part 1- *Crinum* alkaloids: lycorine-type alkaloids. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **2012**, *3* (7), 1883.
36. Frahm, A. W.; Ali, A. A.; Kating, H., Alkaloids of *Crinum augustum*. 3. Relative Configuration of the alkaloid augustine. *Phytochemistry* **1981**, *20* (7), 1735-1738.
37. Jin, Z., Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Natural Product Reports* **2003**, *20* (6), 606-614.
38. Tallini, L. R.; Torras-Claveria, L.; Borges, W. D. S.; Kaiser, M.; Viladomat, F.; Zuanazzi, J. A. S.; Bastida, J., *N*-oxide alkaloids from *Crinum amabile* (Amaryllidaceae). *Molecules* **2018**, *23* (6), 1277.
39. Crouch, N. R.; Pohl, T. L.; Mulholland, D. A.; Ndlovu, E., Alkaloids from three ethnomedicinal *Haemanthus* species: *H. albiflos*, *H. deformis* and *H. paucifolius* (Amaryllidaceae). *South African Journal of Botany* **2005**, *71* (1), 49-52.
40. Baudouin, G.; Tillequin, F.; Koch, M., Albiflomanthine- a crinane alkaloid from *Haemanthus albiflos* (Jacq). *Heterocycles* **1994**, *38* (5), 965-970.
41. Nair, J. J.; Campbell, W. E.; Gammon, D. W.; Albrecht, C. F.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J., Alkaloids from *Crinum delagoense*. *Phytochemistry* **1998**, *49* (8), 2539-2543.
42. Furst, R., Narciclasine - an Amaryllidaceae alkaloid with potent antitumor and anti-inflammatory properties. *Planta Medica* **2016**, *82* (16), 1389-1394.
43. Rigby, J. H.; Maharroof, U. S. M.; Mateo, M. E., Studies on the narciclasine alkaloids: Total synthesis of (+)-narciclasine and (+)-pancratistatin. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122* (28), 6624-6628.

44. Gonzalez, D.; Martinot, T.; Hudlicky, T., A short chemoenzymatic synthesis of (+)-narciclasine. *Tetrahedron Letters* **1999**, *40* (16), 3077-3080.
45. Southgate, E. H.; Holycross, D. R.; Sarlah, D., Total synthesis of lycoricidine and narciclasine by chemical dearomatization of bromobenzene. *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56* (47), 15049-15052.
46. Furusawa, E.; Furusawa, S.; Tani, S.; Irie, H.; Kitamura, K.; Wildman, W. C., Isolation of pretazettine from *Narcissus tazetta* L. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1976**, *24* (2), 336-338.
47. Herke, K.; Hazai, L.; Santa, Z.; Dubrovay, Z.; Hada, V.; Szantay, C.; Kalaus, G.; Szantay, C., An unexpected rearrangement of the benzofurobenzazepine skeleton of galanthamine-type alkaloids. *Tetrahedron Lett* **2010**, *51* (52), 6932-6934.
48. Kreh, M., *In Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles*. Taylor and Francis: 2002; Vol. 21.
49. Krstenansky, J. L., Mesembrine alkaloids: Review of their occurrence, chemistry, and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* **2017**, *195*, 10-19.
50. Döpke, W., Zur Struktur des Alkaloids Amisin. *Zeitschrift für Chemie* **1980**.
51. Masi, M.; van der Westhuyzen, A. E.; Tabanca, N.; Evidente, M.; Cimmino, A.; Green, I. R.; Bernier, U. R.; Becnel, J. J.; Bloomquist, J. R.; van Otterlo, W. A. L.; Evidente, A., Sarniensine, a mesembrine-type alkaloid isolated from *Nerine sarniensis*, an indigenous South African Amaryllidaceae, with larvicidal and adulticidal activities against *Aedes aegypti*. *Fitoterapia* **2017**, *116*, 34-38.
52. Berkov, S.; Martinez-Frances, V.; Bastida, J.; Codina, C.; Rios, S., Evolution of alkaloid biosynthesis in the genus *Narcissus*. *Phytochemistry* **2014**, *99*, 95-106.
53. Pigni, N. B.; Rios-Ruiz, S.; Luque, F. J.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J., Wild daffodils of the section *Ganymedes* from the Iberian Peninsula as a source of mesembrine alkaloids. *Phytochemistry* **2013**, *95*, 384-393.
54. Harvey, A. L.; Young, L. C.; Viljoen, A. M.; Gericke, N. P., Pharmacological actions of the South African medicinal and functional food plant *Sceletium tortuosum* and its principal alkaloids. *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, *137* (3), 1124-1129.
55. Gericke, N.; Viljoen, A. M., *Sceletium*-A review update. *Journal of Ethnopharmacology* **2008**, *119* (3), 653-663.
56. Unver, N.; Kaya, G. I.; Werner, C.; Verpoorte, R.; Gozler, B., Galanthindole: A new indole alkaloid from *Galanthus plicatus* ssp *byzantinus*. *Planta Medica* **2003**, *69* (9), 869-871.
57. Unver, N., New skeletons and new concepts in Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry Reviews* **2007**, *6* (1), 125-135.
58. Unver, N.; Noyan, S.; Gozler, B.; Gozler, T.; Werner, C.; Hesse, M., Four new Amaryllidaceae alkaloids from *Galanthus gracilis* and *Galanthus plicatus* subsp *byzantinus*. *Heterocycles* **2001**, *55* (4), 641-652.
59. Berkov, S.; Evstatieva, L.; Popov, S., Alkaloids in Bulgarian *Panocratium maritimum* L. *Zeitschrift für Naturforschung C* **2004**, *59* (1-2), 65-69.
60. Emir, C.; Emir, A.; Bozkurt, B.; Kaya, G.; Onur, M.; Somer, N. U., Phytochemical studies on *Galanthus gracilis* L. *Planta Medica* **2015**, *81* (16), 1430-1430.
61. Unver, N.; Gozler, T.; Walch, N.; Gozler, B.; Hesse, M., Two novel dinitrogenous alkaloids from *Galanthus plicatus* subsp. *byzantinus* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry* **1999**, *50* (7), 1255-1261.
62. Wang, H. Y.; Qu, S. M.; Wang, Y.; Wang, H. T., Cytotoxic and anti-inflammatory active plicamine alkaloids from *Zephyranthes grandiflora*. *Fitoterapia* **2018**, *130*, 163-168.
63. Zhan, G. Q.; Zhou, J. F.; Liu, R.; Liu, T. T.; Guo, G. L.; Wang, J. P.; Xiang, M.; Xue, Y. B.; Luo, Z. W.; Zhang, Y. H.; Yao, G. M., Galanthamine, plicamine, and secoplicamine alkaloids from *Zephyranthes candida* and their anti-acetylcholinesterase and anti-inflammatory activities. *Journal of Natural Products* **2016**, *79* (4), 760-766.

64. Viladomat, F.; Bastida, J.; Codina, C.; Campbell, W. E.; Mathee, S., Alkaloids from *Boophane flava*. *Phytochemistry* **1995**, *40* (1), 307-311.
65. Hoarau, C.; Couture, A.; Deniau, E.; Grandclaudeon, P., Total synthesis of Amaryllidaceae alkaloid buflavine. *Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67* (16), 5846-5849.
66. Machocho, A. K.; Bastida, J.; Codina, C.; Viladomat, F.; Brun, R.; Chhabra, S. C., Augustamine type alkaloids from *Crinum kirkii*. *Phytochemistry* **2004**, *65* (23), 3143-3149.
67. Velten, R.; Erdelen, C.; Gehling, M.; Gohrt, A.; Gondol, D.; Lenz, J.; Lockhoff, O.; Wachendorff, U.; Wendisch, D., Cripowellin A and B, a novel type of Amaryllidaceae alkaloid from *Crinum powellii*. *Tetrahedron Lett* **1998**, *39* (13), 1737-1740.
68. Presley, C. C.; Krai, P.; Dalal, S.; Su, Q. X.; Cassera, M.; Goetz, M.; Kingston, D. G. I., New potentially bioactive alkaloids from *Crinum erubescens*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2016**, *24* (21), 5418-5422.
69. Safratova, M.; Host'alkova, A.; Hulcova, D.; Breiterova, K.; Hrabcova, V.; Machado, M.; Fontinha, D.; Prudencio, M.; Kunes, J.; Chlebek, J.; Jun, D.; Hrabanova, M.; Novakova, L.; Havelek, R.; Seifrtova, M.; Opletal, L.; Cahlikova, L., Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity. *Archives of Pharmacal Research* **2018**, *41* (2), 208-218.
70. Katoch, D.; Singh, B., Phytochemistry and pharmacology of genus *Zephyranthes*. *Journal of Medicinal and Aromatic Plants* **2015**, *4* (212), 2167-0412.1000212.
71. Kornienko, A.; Evidente, A., Chemistry, biology, and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *Chemical Reviews* **2008**, *108* (6), 1982-2014.
72. Meerow, A. W.; Fay, M. F.; Guy, C. L.; Li, Q. B.; Zaman, F. Q.; Chase, M. W., Systematics of Amaryllidaceae based on cladistic analysis of plastid rbcL and trnL-F sequence data. *American Journal of Botany* **1999**, *86* (9), 1325-1345.
73. WFO *Zephyranthes* Herb [online]. [cit. 2020-09-11]. Dostupné z: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-4000041195>
74. Tapia-Campos, E.; Rodriguez-Dominguez, J. M.; Revuelta-Arreola, M.; Van Tuyl, J. M.; Barba-Gonzalez, R., Mexican geophytes II. The genera *Hymenocallis*, *Sprekelia* and *Zephyranthes*. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* **2012**, *6* (1), 129-139.
75. Pettit, G. R.; Cragg, G. M.; Singh, S. B.; Duke, J. A.; Doubek, D. L., Antineoplastic Agents .162. *Zephyranthes candida*. *Journal of Natural Products* **1990**, *53* (1), 176-178.
76. Luo, Z. W.; Wang, F. Q.; Zhang, J. W.; Li, X. Y.; Zhang, M. K.; Hao, X. C.; Xue, Y. B.; Li, Y.; Horgen, F. D.; Yao, G. M.; Zhang, Y. H., Cytotoxic Alkaloids from the whole plants of *Zephyranthes candida*. *Journal of Natural Products* **2012**, *75* (12), 2113-2120.
77. Zhan, G. Q.; Liu, J. J.; Zhou, J. F.; Sun, B.; Aisa, H. A.; Yao, G. M., Amaryllidaceae alkaloids with new framework types from *Zephyranthes candida* as potent acetylcholinesterase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *127*, 771-780.
78. Oluyemisi, O. O.; Oriabure, A. E.; Adekunle, A. J.; Ramsay, K. S. T.; Shyyaula, S.; Choudhary, M. I., Bioassay-guided isolation of *Poliovirus*-inhibiting constituents from *Zephyranthes candida*. *Pharmaceutical Biology* **2015**, *53* (6), 882-887.
79. Zhan, G. Q.; Qu, X. L.; Liu, J. J.; Tong, Q. Y.; Zhou, J. F.; Sun, B.; Yao, G. M., Zephycandidine A, the first naturally occurring imidazo[1,2-f] phenanthridine alkaloid from *Zephyranthes candida*, exhibits significant anti-tumor and anti-acetylcholinesterase activities. *Scientific Reports* **2016**, *6* (1), 1-9.
80. Shitara, N.; Hirasawa, Y.; Hasumi, S.; Sasaki, T.; Matsumoto, M.; Wong, C. P.; Kaneda, T.; Asakawa, Y.; Morita, H., Four new Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes candida*. *Journal of Natural Medicines* **2014**, *68* (3), 610-614.

81. Zhan, G. Q.; Zhou, J. F.; Liu, J. J.; Huang, J. F.; Zhang, H. Q.; Liu, R.; Yao, G. M., Acetylcholinesterase inhibitory alkaloids from the whole plants of *Zephyranthes carinata*. *Journal of Natural Products* **2017**, *80* (9), 2462-2471.
82. Kojima, K.; Mutsuga, M.; Inoue, M.; Ogihara, Y., Two alkaloids from *Zephyranthes carinata*. *Phytochemistry* **1998**, *48* (7), 1199-1202.
83. Mutsuga, M.; Kojima, K.; Nose, M.; Inoue, M.; Ogihara, Y., Cytotoxic activities of alkaloids from *Zephyranthes carinata*. *Natural medicines* **2001**, *55* (4), 201-204.
84. Cortes, N.; Sabogal-Guaqueta, A. M.; Cardona-Gomez, G. P.; Osorio, E., Neuroprotection and improvement of the histopathological and behavioral impairments in a murine Alzheimer's model treated with *Zephyranthes carinata* alkaloids. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2019**, *110*, 482-492.
85. Herrera, M. R.; Machocho, A. K.; Brun, R.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J., Crinane and lycorane type alkaloids from *Zephyranthes citrina*. *Planta Medica* **2001**, *67* (2), 191-193.
86. Singh, U. P.; Gohain, L.; Maurya, S.; Singh, A.; Pandey, V. B.; Singh, A. K., Antifungal activity of two alkaloids of *Zephyranthes citrina* and their field efficacy against powdery mildew (*Erysiphe cichoracearum*) of balsam. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* **2010**, *43* (3), 302-311.
87. Reyes-Chilpa, R.; Berkov, S.; Hernandez-Ortega, S.; Jankowski, C. K.; Arseneau, S.; Clotet-Codina, I.; Este, J. A.; Codina, C.; Viladomat, F.; Bastida, J., Acetylcholinesterase-inhibiting alkaloids from *Zephyranthes concolor*. *Molecules* **2011**, *16* (11), 9520-9533.
88. Ortiz, J. E.; Berkov, S.; Pigni, N. B.; Theoduloz, C.; Roitman, G.; Tapia, A.; Bastida, J.; Feresin, G. E., Wild Argentinian Amaryllidaceae, a new renewable source of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine and other alkaloids. *Molecules* **2012**, *17* (11), 13473-13482.
89. Katoch, D.; Kumar, D.; Padwad, Y. S.; Singh, B.; Sharma, U., Narciclasine-4-O- β -D-xylopyranoside, a new narciclasine glycoside from *Zephyranthes minuta*. *Natural Product Research* **2020**, *34* (2), 233-240.
90. Pettit, G. R.; Gaddamidi, V.; Cragg, G. M., Antineoplastic Agents .105. *Zephyranthes grandiflora*. *Journal of Natural Products* **1984**, *47* (6), 1018-1020.
91. Katoch, D.; Kumar, S.; Kumar, N.; Singh, B., Simultaneous quantification of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC-DAD/ESI-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2012**, *71*, 187-192.
92. Cahlikova, L.; Valterova, I.; Macakova, K.; Opletal, L., Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by GC/MS and their cholinesterase activity. *Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2011**, *21* (4), 575-580.
93. Katoch, D.; Kumar, D.; Sharma, U.; Kumar, N.; Padwad, Y. S.; Lal, B.; Singh, B., Zephgrabetaine: a new betaine-type Amaryllidaceae alkaloid from *Zephyranthes grandiflora*. *Natural Products Communication* **2013**, *8* (2), 161-164.
94. Ghosal, S.; Razdan, S., (+)-Epimaritidine, an alkaloid from *Zephyranthes rosea*. *Phytochemistry* **1985**, *24* (3), 635-637.
95. Boit, H. G.; Dopke, W.; Stender, W., Alkaloide aus *Crinum*-, *Zephyranthes*-, *Leucojum*- und *Clivia*-Arten. *Chemische Berichte-Recueil* **1957**, *90* (10), 2203-2206.
96. Greathouse, G. A.; Rigler, N. E., Alkaloids from *Zephyranthes texana*, *Cooperia pedunculata* and other Amaryllidaceae and their toxicity to *Phymatotrichum omnivorum*. *American Journal of Botany* **1941**, 702-704.
97. WFO *Zephyranthes candida* (Lindl.) Herb [online]. [cit. 2020-10-11]. Dostupné z: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000752298>
98. Plants of the world online. *Zephyranthes candida* [online]. [cit. 2020-10-11]. Dostupné z: <http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:67201-1#distribution-map>

99. Hoskovec, L. *Zephyranthes candida* (Lindl.) Herb. [online]. [cit. 2020-10-11]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/zephyranthes-candida/>
100. WFO *Zephyranthes carinata* Herb. [online]. [cit. 2020-10-11]. Dostupné z: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000752542>
101. Plants of the world online. *Zephyranthes carinata* Herb. [online]. [cit. 2020-10-11]. Dostupné z: <http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:270933-2#distribution-map>
102. WFO *Zephyranthes citrina* Baker. [online]. [cit. 2020-11-11]. Dostupné z: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000752509>
103. Plants of the world online. [online]. [cit. 2020-11-11]. *Zephyranthes citrina* Baker. <http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:67211-1>
104. Prakash, J.; Vedanayaki, S., Organoleptic, fluorescence, qualitative and quantitative analysis of bulb extract of *Zephyranthes citrina*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **2019**, 8 (3), 2531-2536.
105. WFO *Zephyranthes concolor* (Lindl.) Benth. & Hook.f. [online]. [cit. 2020-11-11]. Dostupné z: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000752513>
106. Plants of the world online. *Zephyranthes concolor* (Lindl.) Benth. & Hook. [online]. [cit. 2020-11-11]. Dostupné z: <http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:67216-1>
107. Flagg, R. O.; Smith, G. L.; Garcia-Mendoza, A. J., *Zephyranthes pseudoconcolor* (Amaryllidaceae: Amaryllidoideae), a new species from Mexico, and clarification of *Z. concolor*. *Novon* **2018**, 26 (3), 290-297.
108. WFO *Zephyranthes minuta* (Kunth) D. Dietr. [online]. [cit. 2020-11-11]. Dostupné z: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000752405#description>
109. Plants of the world online. *Zephyranthes minuta* (Kunth) D. Dietr. [online]. [cit. 2020-11-11]. Dostupné z: <http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:67266-1>
110. WFO *Zephyranthes rosea* Lindl. [online]. [cit. 2020-11-11]. Dostupné z: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000752515>
111. World flora online. *Zephyranthes rosea* Lindl. [online]. [cit. 2020-11-11]. Dostupné z: <http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:67293-1#distribution-map>
112. WFO *Habranthus tubispathus* (L'Hér.) Traub. [online]. [cit. 2020-11-11]. Dostupné z: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000646862>
113. World flora online. *Habranthus tubispathus* (L'Hér.) Traub. [online]. [cit. 2020-11-11]. Dostupné z: <http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:67314-1#bibliography>
114. Kovář, L. *Habranthus tubispathus* (L'Hér.) Traub. [online]. [cit. 2020-11-11]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/habranthus-tubispathus/>
115. Cavallaro, V.; Alza, N. P.; Murray, M. G.; Murray, A. P., Alkaloids from *Habranthus tubispathus* and *H. jamesonii*, two Amaryllidaceae with acetyl- and butyrylcholinesterase inhibition activity. *Natural Products Communication* **2014**, 9 (2), 1934578X1400900206.
116. WFO *Pyrolirion flavum* Herb. [online]. [cit. 2020-11-11]. Dostupné z: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000727083>
117. Ghosal, S.; Singh, S. K.; Srivastava, R. S., Alkaloids of *Zephyranthes flava*. *Phytochemistry* **1986**, 25 (8), 1975-1978.
118. Ghosal, S.; Singh, S. K.; Unnikrishnan, S. G., Phosphatidylpyrrolphenanthridine alkaloids from *Zephyranthes flava*. *Phytochemistry* **1987**, 26 (3), 823-828.
119. Plant delights nursery, Inc., *Zephyranthes* 'Ajax'. [online]. [cit. 2021-01-07]. Dostupné z: <https://www.plantdelights.com/products/zephyranthes-ajax>
120. Wikipedia. *Zephyranthes*. [online]. [cit. 2021-01-07]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Zephyranthes>

121. Pinterest. *Habranthus tubispathus*. [online]. [cit. 2021-01-07]. Dostupné z: <https://cz.pinterest.com/pin/478366791667278283/>
122. Commons.wikimedia. *Zephyranthes grandiflora*. [online]. [cit. 2021-01-07]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Zephyranthes_grandiflora_-_Pink_rain_lily,_Adana_2017-08-07_01-1.jpg
123. Safratova, M.; Novak, Z.; Kulhankova, A.; Kunes, J.; Hrabnova, M.; Jun, D.; Macakova, K.; Opletal, L.; Cahlikova, L., Revised NMR data for 9-*O*-demethylgalanthine: an alkaloid from *Zephyranthes robusta* (Amaryllidaceae) and its biological activity. *Natural Products Communication* **2014**, *9* (6), 787-788.
124. Ozeki, S., Studies on the alkaloids of *Zephyranthes candida* Herb. I. The isolation of bases. *Yakugaku Zasshi* **1964**, *84*, 1194-7.
125. Kobayashi, S.; Ishikawa, H.; Kihara, M.; Shingu, T.; Hashimoto, T., Isolation of carinatine and pretazettine from bulbs of *Zephyranthes carinata* Herb. (Amaryllidaceae). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1977**, *25* (9), 2244-2248.
126. Kulhankova, A.; Cahlikova, L.; Novak, Z.; Macakova, K.; Kunes, J.; Opletal, L., Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and their acetylcholinesterase- and butyrylcholinesterase-inhibitory activity. *Chemistry & Biodiversity* **2013**, *10* (6), 1120-1127.
127. Boit, H. G.; Ehmke, H., Alkaloide von *Sprekelia formosissima*, *Galanthus elwesii*, *Zephyranthes candida* und *Crinum powellii*. 8. Über Amaryllidaceen Alkaloide. *Chemische Berichte-Recueil* **1955**, *88* (10), 1590-1594.
128. Ozeki, S., Structure of zephyranthine, new alkaloid isolated from *Zephyranthes candida* Herb. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1964**, *12* (2), 253.
129. Krishna Rao, R.; Seshagiri Rao, J., Occurrence of the rare alkaloid maritidine in *Zephyranthes robusta* and *Zephyranthes sulphurea*. *Current science* **1979**.
130. Jiráček, R., Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Praktické lékařství* **2009**, *5* (4), 176-178.
131. Jiráček, R., Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Praktické lékařství* **2012**, *8* (3), 107-108.
132. Francis, P. T.; Palmer, A. M.; Snape, M.; Wilcock, G. K., The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* **1999**, *67* (4), 558-558.
133. Greig, N. H.; Lahiri, D. K.; Sambamurti, K., Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy. *International Psychogeriatrics* **2002**, *14*, 77-91.
134. Maříková, J.; Řitomská, A.; Korábečný, J.; Peřinová, R.; Al Mamun, A.; Kučera, T.; Kohelová, E.; Hulcová, D.; Kobrlová, T.; Kuneš, J., Aromatic esters of the crinane Amaryllidaceae alkaloid ambelline as selective inhibitors of butyrylcholinesterase. *Journal of Natural Products* **2020**, *83* (5), 1359-1367.
135. Konrath, E. L.; Passos, C. D.; Klein, L. C.; Henriques, A. T., Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2013**, *65* (12), 1701-1725.
136. Elgorashi, E. E.; Stafford, G. I.; Van Staden, J., Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta medica* **2004**, *70* (03), 260-262.
137. Rhee, I. K.; Appels, N.; Hofte, B.; Karabatak, B.; Erkelens, C.; Stark, L. M.; Flippin, L. A.; Verpoorte, R., Isolation of the acetylcholinesterase inhibitor ungeremine from *Nerine bowdenii* by preparative HPLC coupled on-line to a flow assay system. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2004**, *27* (11), 1804-1809.
138. López, S.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C., Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life sciences* **2002**, *71* (21), 2521-2529.

139. Zhu, Y. Y.; Li, X.; Yu, H. Y.; Xiong, Y. F.; Zhang, P.; Pi, H. F.; Ruan, H. L., Alkaloids from the bulbs of *Lycoris longituba* and their neuroprotective and acetylcholinesterase inhibitory activities. *Archives of Pharmacal Research* **2015**, *38* (5), 604-613.
140. Emir, A.; Emir, C.; Bozkurt, B.; Onur, M. A.; Bastida, J.; Somer, N. U., Alkaloids from *Galanthus fosteri*. *Phytochemistry Letters* **2016**, *17*, 167-172.
141. Iannello, C.; Pigni, N. B.; Antognoni, F.; Poli, F.; Maxia, A.; de Andrade, J. P.; Bastida, J., A potent acetylcholinesterase inhibitor from *Pancreatum illyricum* L. *Fitoterapia* **2014**, *92*, 163-167.
142. Orhan, I. E.; Deniz, F. S. S.; Eren, G.; Sener, B., Molecular approach to promising cholinesterase inhibitory effect of several Amaryllidaceae alkaloids: further re-investigation. *South African Journal of Botany* **2020**.
143. Vaneckova, N.; Host'alkova, A.; Safratova, M.; Kunes, J.; Hulcova, D.; Hrabnova, M.; Doskocil, I.; Stepankova, S.; Opletal, L.; Novakova, L.; Jun, D.; Chlebek, J.; Cahlikova, L., Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii* W. Watson and their biological activities. *RSC Advances* **2016**, *6* (83), 80114-80120.
144. Adessi, T. G.; Borioni, J. L.; Pigni, N. B.; Bastida, J.; Cavallaro, V.; Murray, A. P.; Puiatti, M.; Oberti, J. C.; Leiva, S.; Nicotra, V. E., *Clinanthus microstephium*, an Amaryllidaceae species with cholinesterase inhibitor alkaloids: structure-activity analysis of haemanthamine skeleton derivatives. *Chemistry & biodiversity* **2019**, *16* (5), e1800662.
145. Sibanyoni, M. N.; Chaudhary, S. K.; Chen, W. Y.; Adhami, H. R.; Combrinck, S.; Maharaj, V.; Schuster, D.; Viljoen, A., Isolation, *in vitro* evaluation and molecular docking of acetylcholinesterase inhibitors from South African Amaryllidaceae. *Fitoterapia* **2020**, *146*, 104650.
146. Hernandez, F.; de Barreda, E. G.; Fuster-Matanzo, A.; Goni-Oliver, P.; Lucas, J. J.; Avila, J., The role of GSK3 in Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin* **2009**, *80* (4-5), 248-250.
147. Hernandez, F.; de Barreda, E. G.; Fuster-Matanzo, A.; Lucas, J. J.; Avila, J., GSK3: A possible link between beta amyloid peptide and tau protein. *Experimental Neurology* **2010**, *223* (2), 322-325.
148. Hulcova, D.; Breiterova, K.; Siatka, T.; Klimova, K.; Davani, L.; Safratova, M.; Host'alkova, A.; De Simone, A.; Andrisano, V.; Cahlikova, L., Amaryllidaceae alkaloids as potential glycogen synthase kinase-3 beta inhibitors. *Molecules* **2018**, *23* (4), 719.
149. Amiri, H.; Saeidi, K.; Borhani, P.; Manafirad, A.; Ghavami, M.; Zerbi, V., Alzheimer's disease: pathophysiology and applications of magnetic nanoparticles as MRI theranostic agents. *ACS Chemical Neuroscience* **2013**, *4* (11), 1417-1429.
150. Tam, J. H. K.; Pasternak, S. H., Amyloid and Alzheimer's Disease: inside and out. *Canadian Journal of Neurological Sciences* **2012**, *39* (3), 286-298.
151. Gouras, G. K.; Willen, K.; Faideau, M., The inside-out amyloid hypothesis and synapse pathology in Alzheimer's disease. *Neurodegenerative Diseases* **2014**, *13* (2-3), 142-146.
152. De Strooper, B.; Chavez Gutierrez, L., Learning by failing: ideas and concepts to tackle gamma-secretases in Alzheimer's disease and beyond. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2015**, *55*, 419-37.
153. Zhou, Y.; Sun, Y.; Ma, Q. H.; Liu, Y., Alzheimer's disease: amyloid-based pathogenesis and potential therapies. *Cell Stress* **2018**, *2* (7), 150-161.
154. Natunen, T. A.; Gynther, M.; Rostalski, H.; Jaako, K.; Jalkanen, A. J., Extracellular prolyl oligopeptidase derived from activated microglia is a potential neuroprotection target. *Basic and Clinical Pharmacology* **2019**, *124* (1), 40-49.
155. Svarebáhs, R.; Julku, U.; Kilpelainen, T.; Kyyro, M.; Jantti, M.; Myohanen, T. T., New tricks of prolyl oligopeptidase inhibitors - a common drug therapy for several neurodegenerative diseases. *Biochemical Pharmacology* **2019**, *161*, 113-120.
156. Al Shammari, L.; Hulcová, D.; Maříková, J.; Kučera, T.; Šafratová, M.; Nováková, L.; Schmidt, M.; Pulkrábková, L.; Janoušek, J.; Soukup, O., Amaryllidaceae alkaloids from *Hippeastrum x*

- hybridum* cv. Ferrari, and preparation of vittatine derivatives as potential ligands for Alzheimer's disease. *South African Journal of Botany* **2020**, *136*, 137-146.
157. World Health Organization. Cancer. [online]. [cit. 2021-01-07]. Dostupné z: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1
 158. National Cancer Institut. What is cancer. [online]. [cit. 2021-01-07]. Dostupné z: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
 159. Kinghorn, A. D.; Chin, Y. W.; Swanson, S. M., Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. *Current Opinion in Drug Discovery and Development* **2009**, *12* (2), 189-196.
 160. Cragg, G. M.; Kingston, D. G.; Newman, D. J., *Anticancer agents from natural products*. CRC press: 2011.
 161. Dalecká, M., Havelek, R., Královec, K., Brůčková, L. and L. Cahlíková, Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy* **2013**, *107* (9), 701.
 162. Nair, J. J.; Rarova, L.; Strnad, M.; Bastida, J.; van Staden, J., Apoptosis-inducing effects of distichamine and narciprimine, rare alkaloids of the plant family Amaryllidaceae. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22* (19), 6195-6199.
 163. Havelek, R.; Muthna, D.; Tomsik, P.; Kralovec, K.; Seifrtova, M.; Cahlikova, L.; Hostalkova, A.; Safratova, M.; Perwein, M.; Cermakova, E.; Rezacova, M., Anticancer potential of Amaryllidaceae alkaloids evaluated by screening with a panel of human cells, real-time cellular analysis and Ehrlich tumor-bearing mice. *Chem-Biol Interact* **2017**, *275*, 121-132.
 164. Hostalkova, A.; Marikova, J.; Opletal, L.; Korabecny, J.; Hulcova, D.; Kunes, J.; Novakova, L.; Perez, D. I.; Jun, D.; Kucera, T.; Andrisano, V.; Siatka, T.; Cahlikova, L., Isoquinoline alkaloids from *Berberis vulgaris* as potential lead compounds for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Natural Products* **2019**, *82* (2), 239-248.
 165. Havelek, R.; Seifrtova, M.; Kralovec, K.; Bruckova, L.; Cahlikova, L.; Dalecka, M.; Vavrova, J.; Rezacova, M.; Opletal, L.; Bilkova, Z., The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells. *Phytomedicine* **2014**, *21* (4), 479-490.
 166. Breiterová, K., Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii civilizačních onemocnění. Disertační práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2019.
 167. Stefan Kaufmann, D. K., *Immunology of infection*. 2. vydání.; Elsevier Academic Press: Amsterdam, 2002; Vol. 32.
 168. Abou-Donia, A.; Darwish, F.; Amer, M.; Kassem, F.; Hammada, H.; Shin, Y.-G., Alkaloids from *Narcissus* cv. Ice Follies cultivated in Egypt. *Alexandria Journal of Pharmaceutical Sciences* **2002**, *16* (2), 96-98.
 169. Bastida, J.; Codina, C.; Viladomat, F.; Rubiralta, M.; Quirion, J.-C.; Husson, H.-P.; Ma, G.-e., *Narcissus* alkaloids, XIII. Complete assignment of the NMR spectra of papyramine and 6-*epi*-papyramine by two-dimensional NMR spectroscopy. *Journal of natural products* **1990**, *53* (6), 1456-1462.
 170. Berkov, S.; Bastida, J.; Sidjimova, B.; Viladomat, F.; Codina, C., Phytochemical differentiation of *Galanthus nivalis* and *Galanthus elwesii* (Amaryllidaceae): a case, study. *Biochemical Systematics and Ecology* **2008**, *36* (8), 638-645.
 171. Viladomat, F.; Codina, C., Bastida, J.; Mathee, S.; Campbell, W. E., Further alkaloids from *Brunsvigia josephinae*. *Phytochemistry* **1995**, *40* (3), 961-965.
 172. Maříková, J. NMR spektroskopie ve strukturní analýze izolovaných alkaloidů. Disertační práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2021.

173. de Andrade, J. P.; Guo, Y.; Font-Bardia, M.; Calvet, T.; Dutilh, J.; Viladomat, F.; Codina, C.; Nair, J. J.; Zuanazzi, J. A. S.; Bastida, J., Crinine- type alkaloids from *Hippeastrum aulicum* and *H. calyptratum*. *Phytochemistry* **2014**, *103*, 188-195.
174. Kohelova, E.; Marikova, J.; Korabecny, J.; Hulcova, D.; Kucera, T.; Jun, D.; Chlebek, J.; Jenco, J.; Safratova, M.; Hrabnova, M.; Ritomska, A.; Malanik, M.; Perinova, R.; Breiterova, K.; Kunes, J.; Novakova, L.; Opletal, L.; Cahlikova, L., Alkaloids of *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae) and their implication to Alzheimer's disease: isolation, structural elucidation and biological activity. *Bioorganic Chemistry* **2021**, *107*, 104567.
175. Chen, C. K.; Lin, F. H.; Tseng, L. H.; Jiang, C. L.; Lee, S. S., Comprehensive study of alkaloids from *Crinum asiaticum* var. *sinicum* assisted by HPLC-DAD-SPE-NMR. *Journal of Natural Products* **2011**, *74* (3), 411-419.
176. Bastida, J.; Lavilla, R.; Viladomat, F., Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. *The alkaloids: chemistry and biology* **2006**, *63*, 87-179.
177. Crain, W. O.; Wildman, W. C.; Roberts, J. D., Nuclear magnetic resonance spectroscopy C-13 spectra of nicotine, quinine, and some Amaryllidaceae alkaloids. *Journal of the American Chemical Society* **1971**, *93* (4), 990-&.
178. Kihara, M.; Ozaki, T.; Kobayashi, S.; Shingu, T., Alkaloidal constituents of *Leucojum autumnale* L.(Amaryllidaceae). *Chemical and pharmaceutical bulletin* **1995**, *43* (2), 318-320.
179. Wijnberg, J.; Speckamp, W., Total syntheses of dl-mesembrine, dl-dihydromaritidine and dl-epi-dihydromaritidine via regioselective NaBH₄/H⁺ reduction of imides. *Tetrahedron* **1978**, *34* (16), 2579-2586.
180. Tallini, L. R.; de Andrade, J. P.; Kaiser, M.; Viladomat, F.; Nair, J. J.; Zuanazzi, J. A. S.; Bastida, J., Alkaloid constituents of the Amaryllidaceae plant *Amaryllis belladonna* L. *Molecules* **2017**, *22* (9), 1437.
181. Berkov, S.; Pavlov, A.; Ilieva, M.; Burrus, M.; Popov, S.; Stanilova, M., CGC-MS of alkaloids in *Leucojum aestivum* plants and their *in vitro* cultures. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques* **2005**, *16* (2), 98-103.
182. Berkov, S.; Sidjimova, B.; Evstatieva, L.; Popov, S., Intraspecific variability in the alkaloid metabolism of *Galanthus elwesii*. *Phytochemistry* **2004**, *65* (5), 579-586.
183. Abou-Donia, A. H.; Toaima, S. M.; Hammada, H. M.; Shawky, E.; Kinoshita, E.; Takayama, H., Phytochemical and biological investigation of *Hymenocallis littoralis* SALISB. *Chemistry & Biodiversity* **2008**, *5* (2), 332-340.
184. Chen, J.-Q.; Xie, J.-H.; Bao, D.-H.; Liu, S.; Zhou, Q.-L., Total synthesis of (-)-galanthamine and (-)-lycoramine via catalytic asymmetric hydrogenation and intramolecular reductive Heck cyclization. *Organic letters* **2012**, *14* (11), 2714-2717.
185. Huang, S. D.; Zhang, Y.; He, H. P.; Li, S. F.; Tang, G. H.; Chen, D. Z.; Cao, M. M.; Di, Y. T.; Hao, X. J., A new Amaryllidaceae alkaloid from the bulbs of *Lycoris radiata*. *Chinese Journal of Natural Medicines* **2013**, *11* (4), 406-410.
186. Bastida, J.; Fernandez, J. M.; Viladomat, F.; Codina, C.; Delafuente, G., *Narcissus* alkaloids .21. Alkaloids from *Narcissus tortuosus*. *Phytochemistry* **1995**, *38* (2), 549-551.
187. Ingrassia, L.; Lefranc, F.; Dewelle, J.; Pottier, L.; Mathieu, V.; Spiegl-Kreinecker, S.; Sauvage, S.; El Yazidi, M.; Dehoux, M.; Berger, W.; Van Quaquebeke, E.; Kiss, R., Structure-activity relationship analysis of novel derivatives of narciclasine (an Amaryllidaceae isocarbostryl derivative) as potential anticancer agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52* (4), 1100-1114.
188. Mutsuga, M.; Kojima, K.; Yamashita, M.; Ohno, T.; Ogihara, Y.; Inoue, M., Inhibition of cell cycle progression through specific phase by pancratistatin derivatives. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2002**, *25* (2), 223-228.

189. Wang, P.; Yuan, H. H.; Zhang, X.; Li, Y. P.; Shang, L. Q.; Yin, Z., Novel lycorine derivatives as anticancer agents: synthesis and *in vitro* biological evaluation. *Molecules* **2014**, *19* (2), 2469-2480.
190. Maltese, F.; van der Kooy, F.; Verpoorte, R., Solvent derived artifacts in natural products chemistry. *Natural Products Communication* **2009**, *4* (3), 447-454.
191. Maříková, J.; Mamun, A. A.; Shammari, L. A.; Korábečný, J.; Kučera, T.; Hulcová, D.; Kuneš, J.; Malaník, M.; Vašková, M.; Kohelová, E., Structure elucidation and cholinesterase inhibition activity of two new minor Amaryllidaceae alkaloids. *Molecules* **2021**, *26* (5), 1279.
192. Kasteel, E. E. J.; Nijmeijer, S. M.; Darney, K.; Lautz, L. S.; Dorne, J. L. C. M.; Kramer, N. I.; Westerink, R. H. S., Acetylcholinesterase inhibition in electric eel and human donor blood: an *in vitro* approach to investigate interspecies differences and human variability in toxicodynamics. *Archives of Toxicology* **2020**, *94* (12), 4055-4065.
193. Cahlikova, L.; Hrabinova, M.; Kulhankova, A.; Benesova, N.; Chlebek, J.; Jun, D.; Novak, Z.; Macakova, K.; Kunes, J.; Kuca, K.; Opletal, L., Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase activities. *Natural Products Communication* **2013**, *8* (11), 1541-1544.
194. Mannisto, P. T.; Garcia-Horsman, J. A., Mechanism of action of prolyl oligopeptidase (PREP) in degenerative brain diseases: has peptidase activity only a modulatory role on the interactions of PREP with proteins? *Frontiers in Aging Neuroscience* **2017**, *9* (27).
195. Babkova, K.; Korabecny, J.; Soukup, O.; Nepovimova, E.; Jun, D.; Kuca, K., Prolyl oligopeptidase and its role in the organism: attention to the most promising and clinically relevant inhibitors. *Future Medicinal Chemistry* **2017**, *9* (10), 1015-1038.
196. Meijer, L.; Thunnissen, A. M.; White, A. W.; Garnier, M.; Nikolic, M.; Tsai, L. H.; Walter, J.; Cleverley, K. E.; Salinas, P. C.; Wu, Y. Z.; Biernat, J.; Mandelkow, E. M.; Kim, S. H.; Pettit, G. R., Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3beta and CK1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent. *Chemical Biology* **2000**, *7* (1), 51-63.